

Membranproteomanalyse
des fakultativ intrazellulären Erregers
Listeria monocytogenes

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Maja Baumgärtner
aus Diepholz

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland
2. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn
eingereicht am: 14.6.2004
mündliche Prüfung (Disputation) am 23.8.2004

2004
(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation:

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor oder Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge (Poster):

Baumgärtner, M., Diekmann, O., Jänsch, L., Wehland, J.: Subproteom Analysis of *Listeria monocytogenes*. ISOPOL Meeting, Mannheim (2001).

Baumgärtner, M., Diekmann, O., Kärst, U., Jänsch, L., Trost, M., Wehland, J.: Overcoming the Limitations of Standard 2D Gel-Electrophoresis. DGMS, Heidelberg (2003).

Baumgärtner, M., Wehland, J., Jänsch, L.: Analysis and Validation of Lipoproteins of *Listeria monocytogenes*. BMBF-Statusseminar, Bad Honnef (2003).

Baumgärtner, M., Wehland, J., Jänsch, L.: Lipoproteins of *Listeria monocytogenes*. Functional genomics: From Bacteria to Man, Greifswald (2003).

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungen und Fachbegriffe	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2. Der Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i>	2
1.3. Bakterielle Membranproteine	5
1.4. Bakterielle Lipoproteine	7
1.5. Analyse von Membranproteinen	10
1.6. Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Allgemeine Materialien und Chemikalien	15
2.2. Allgemeine Puffer	15
2.3. Kultivierung von Bakterien	15
2.3.1. Bakterienstämme	15
2.3.2. Kulturmedien und Zusätze	16
2.3.3. Kulturbedingungen	17
2.4. Kultivierung von Gewebezellen	18
2.5. Herstellung von Proteinextrakten	18
2.5.1. Gesamtzellextrakt	18
2.5.2. Extrakte sekretorischer Proteine	19
2.5.3. Extraktion von Membranproteinen durch differentielle Zentrifugation	19
2.5.4. Extraktion von Membranproteinen unter ribosomenstabilisierenden Bedingungen	20
2.5.5. Radioaktiv markierte Lipoproteinextrakte	21
2.5.6. TCA-Acetonfällung	22
2.5.7. Bestimmung der Proteinkonzentration	22

2.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	23
2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.6.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese	24
2.6.3. 16BAC/SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.6.4. Blau Native/Tricine-SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.7. Proteinfärbung	31
2.7.1. Silberfärbung	31
2.7.2. Klassische Coomassie- Färbung	32
2.7.3. Kolloidale Coomassie-Färbung	32
2.7.4. Fluoreszenzfärbung mit RuBPS	33
2.8. Autoradiographie	33
2.9. Immunologischer Nachweis von Proteinen	34
2.9.1. Herstellung polyklonaler Antikörper	34
2.9.2. Aufreinigung polyklonaler Seren	35
2.9.3. Westernblot	36
2.9.4. Immunfärbung und Chemolumineszenz	36
2.10. Massenspektrometrische Analysen zur Proteinidentifizierung	37
2.10.1. MS-Probenvorbereitung	38
2.10.2. MALDI-TOF MS	40
2.10.3. LC-MS	41
2.10.4. Q-TOF-MS	41
2.11. N-terminale Proteinsequenzierung	42
2.12. Infektion von Gewebekulturzellen mit <i>Listeria monocytogenes</i>	42
2.12.1. Ausplattierung intrazellulärer Bakterien	43
2.12.2. Immunfluoreszenzaufnahmen fixierter Zellen	43
2.13. Molekularbiologische Methoden	45
2.13.1. Plasmide	45
2.13.2. Oligonukleotide	46
2.13.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
2.13.4. Agarosegelelektrophorese	47
2.13.5. DNA-Elution aus Agarosegelen	48
2.13.6. Restriktion von DNA	48
2.13.7. Dephosphorylierung von DNA	49
2.13.8. Ligation von DNA	49

2.13.9. TOPO®- Klonierung	50
2.13.10. Transformation von <i>E. coli</i>	50
2.13.11. Plasmidpräparation	51
2.13.12. Transformation von <i>L. monocytogenes</i>	52
2.13.13. DNA-Sequenzierung	52
2.13.14. Herstellung einer chromosomalen Deletionsmutante	53
3. Ergebnisse	55
3.1. Identifizierung listerieller Membranproteine	55
3.1.1. Fraktionierung und Aufreinigung von Zellmembranen	55
3.1.2. Gelelektrophoretische Auftrennung des Membransubproteoms	56
3.1.3. Gellose Analyse des Membransubproteoms	59
3.1.4. Identifizierung putativ PrfA-regulierter Membranproteine	61
3.2. Analyse listerieller Lipoproteine	65
3.2.1. Annotierung der Lipoproteine von <i>L. monocytogenes</i>	65
3.2.2. Identifizierung von Lipoproteinen mittels radioaktiv markierter Fettsäuren	67
3.2.3. Identifizierung von Lipoproteinen durch Inhibierung der Lipidmodifizierung	68
3.2.3.1. Herstellung und Komplementation einer chromosomalen <i>lgt</i> - Deletionsmutante von <i>L. monocytogenes</i>	69
3.2.3.2. Wachstumskurven des Wildtypstammes, der <i>lgt</i> -Deletionsmutante und der komplementierten Mutante im Vergleich	71
3.2.3.3. Vergleichende Sekretomanalysen des Wildtypstammes, der Δlgt -Mutante und der komplementierten Mutante	72
3.2.4. Analyse der Oligopeptid-Bindungsproteine von <i>L. monocytogenes</i>	79
3.2.5. Einfluss der Lipoproteinmodifizierung auf den Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i>	84
3.2.6. Herstellung und vergleichende Analyse unterschiedlich PrfA-exprimierender Δlgt -Stämme	86
3.2.7. Analyse der Lipoproteine mit Hilfe von Antikörpern	90
3.3. Hinweise auf die Prozessierung der Prälipoproteine durch die SPaseII	93

4. Diskussion	95
4.1. Verfahren zur Analyse von Membranproteinen	95
4.2. Identifizierung listerieller Membranproteine	100
4.3. Analyse der Lipoproteine	105
4.3.1. Verifikation der Lipoproteine	105
4.3.2. Einfluss der Lipidmodifizierung auf den Infektionszyklus	107
4.4. Hinweise auf die Prozessierung der Prälipoproteine durch die SPaseII	116
4.5. Ausblick	118
5. Zusammenfassung	120
6. Literatur	122
7. Danksagung	135
8. Anhang	136

Abkürzungen und Fachbegriffe

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
ABC	„ATP-Binding-Cassette“
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
16BAC	Benzyltrimethyl-n-Hexa-Decylammoniumchlorid
BHI	„Brain Heart Infusion“
BN	„Blau-Native“
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-di-Methylammonio-1-Propan-Sulfonat
CCD	„charge-coupled-device“
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithioereitol (1,4-Dimercapt-2,3-butandiol)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GRAVY	„Grand Average of Hydrophobicity“
h	Stunde(n)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Liter
LC	Flüssigkeitschromatografie
LPXTG	Aminosäuremotiv aus Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin
M	molar
MALDI	„Matrix Assited Laser Desorption Ionisation“
MS	Massenspektrometrie

MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
mM	Millimolar
mL	Milliliter
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen in DNA-Sequenz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pA	per Analysis
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PTS	Phosphotransferasesystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Quadropol
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N,N-tetramethyl-ethylen-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
TOF	Flugdauer („time of flight“)
RuBPS	Ruthenium-Chelat-Komplex
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtypstamm
w/v	Masse pro Volumen
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

Abbildungsverzeichnis

1.1	Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i>	3
1.2	Schematische Darstellung des zentralen Virulenzgenclusters von <i>L. monocytogenes</i> und die Struktur des entsprechenden Genlocus in der apathogenen Spezies <i>L. innocua</i>	4
1.3	Verschiedene Membrantransportsysteme grampositiver Bakterien	6
1.4	Schematischer Aufbau eines Signalpeptids grampositiver Prälipoproteine	7
1.5	Lipoproteinbiosynthese in grampositiven Bakterien (nach Sutcliffe et al., 2001)	8
2.1	Isolation von Membranen mit Hilfe der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation	21
2.2	Plasmidkarten von pAUL-A, Liga157, Liga160 und Liga155	45
3.1	16BAC/SDS-Referenzgel	57
3.2	Vergleich des Membransubproteoms unterschiedlich PrfA-exprimierender Stämme	62
3.3	Anteil der drei Methoden an der Identifizierung von insgesamt 103 Proteinen der aufgereinigten Membranfraktion von <i>L. monocytogenes</i>	64
3.4	Sequenzlogo mit der Lipobox- Konsensussequenz von <i>L. monocytogenes</i>	66
3.5	Radioaktive Markierung von Lipoproteinen	67
3.6	Zweidimensionale Auftrennung der Lipoproteinfraktion	68
3.7	Schematische Darstellung der genetischen Organisation des <i>lgt</i> -Locus in dem EGD Wildtypstamm (A.) und der Δ <i>lgt</i> - Mutante (B.) von <i>L. monocytogenes</i>	69
3.8	Überprüfung verschiedener Klone auf die <i>lgt</i> -Deletion	70
3.9	Wachstumskurven des EGD Wildtypstammes und der <i>lgt</i> -Deletionsmutante	71
3.10	Wachstumskurven des <i>wt</i> Liga157-Stammes, des Δ <i>lgt</i> Liga157 Stammes und der komplementierten Mutante	72
3.11	Modell der Lipoproteinfreisetzung bei der <i>lgt</i> -Deletionsmutante	72
3.12	Theoretische 2D-Karte der 68 putativen Lipoproteine	73
3.13	Vergleich des extrazellulären Proteoms des Δ <i>lgt</i> Liga157-Stammes (blau) und des <i>wt</i> Liga157-Stammes (rot)	74
3.14	Darstellung der zwei Transmembrandomänen von QoxA	75
3.15	Vergleich des extrazellulären Proteoms der komplementierten Mutante (blau) und des <i>wt</i> Liga157-Stammes (rot)	76
3.16	Hochauflösende Auftrennung der extrazellulären Proteine des Δ <i>lgt</i> Liga157-Stammes mit Hilfe von Zoomgelen	77
3.17	Detektion der vier Oligopeptid-Bindungsproteine in dem extrazellulären Proteom der <i>lgt</i> -Deletionsmutante	79

3.18	Sequenzvergleich der vier Oligopeptid-Bindungsproteine von <i>L. monocytogenes</i>	80
3.19	Schematische Darstellung der vier Genloci lmo0152, lmo0135, lmo2569, <i>oppA</i>	81
3.20	Zweidimensionale Auftrennung von listeriellen Proteinkomplexen mittels BN/SDS-PAGE	83
3.21	Anzahl der intrazellulären Bakterien nach einer Stunde im Box-Whisker-Plot	84
3.22	Intrazelluläres Wachstum des Wildtypstammes und der Δ lgt-Mutante von <i>L. monocytogenes</i>	85
3.23	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Wildtypstammes und der Δ lgt-Mutante	86
3.24	Wachstumskurven des Δ lgt/ Δ prfA Liga155-Stammes, des Δ lgt Liga155-Stammes und des PrfA-überexprimierenden Δ lgt-Stammes von <i>L. monocytogenes</i>	87
3.25	Unterschiede in dem extrazellulären Proteom des konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δ lgt-Stammes (A.) und des Δ lgt/ Δ prfA Liga155-Stammes (B.)	89
3.26	Westernblotanalyse extrazellulärer Proteine des Wildtypstammes und der Δ lgt-Mutante	91
3.27	Vergleichende Expressionsanalyse des extrazellulären Proteoms der konstitutiv überexprimierenden Δ lgt-Mutante (<i>prfA</i> +), des Δ lgt Liga155-Stammes (<i>wt</i>) und des Δ lgt/ Δ prfA Liga155-Stammes (Δ) basierend auf Westernblotanalysen	92
3.28	Westernblot der im Kulturüberstand der Δ lgt-Mutante befindlichen Proteine	93
3.29	Vergleich des extrazellulären Proteoms der Δ lgt-Mutante mit und ohne Zugabe von Globomycin	94
4.1	Die Komponenten des Oligopeptidtransportsystems bei <i>L. monocytogenes</i>	115
8.1	Zweidimensionale Auftrennung der Membranproteine von <i>L. monocytogenes</i> mittels BN/SDS-PAGE	141
8.2	Putative Proteinkomplexe von <i>L. monocytogenes</i>	141

Tabellenverzeichnis

2.1	Peptide für die Immunisierung von Kaninchen	34
3.1	Identifizierte Proteinspots aus dem 16BAC/SDS-Referenzgel	58
3.2	Proteine, die mittels der LC-MS/MS-Methode aus der aufgereinigten Membranfraktion identifiziert werden konnten	60
3.3	Putativ PrfA-regulierte Membranproteine	63
3.4	Experimentell bestätigte Lipoproteine von <i>L. monocytogenes</i>	78
3.5	PrfA-regulierte Proteine aus dem Kulturüberstand des $\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155-Stammes, des Δlgt Liga155-Stammes und des konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δlgt -Stammes	90
3.6	Auswahl der Lipoproteine, gegen die Antikörper entwickelt wurden	91
4.1	Einteilung der 103 identifizierten Proteine der aufgereinigten Membranfraktion von <i>L. monocytogenes</i> in funktionelle Kategorien	132
8.1	Identifizierte Proteine aus der aufgereinigten Membranfraktion von <i>L. monocytogenes</i>	136
8.2	Aktualisierte Annotierung der 68 putativen Lipoproteine von <i>L. monocytogenes</i>	139
8.3	Identifizierte Proteinspots aus dem BN/SDS-Gel	142

1. Einleitung

1.1. *Listeria monocytogenes*

Die Gattung *Listeria* besteht aus einer Gruppe grampositiver, nicht sporulierender, fakultativ anaerober Stäbchenbakterien, die phylogenetisch nahe mit den Gattungen *Bacillus*, *Chlostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* verwandt ist (Collins et al., 1991; Sallen et al., 1996). Von den sechs beschriebenen Arten der Gattung *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi*) sind nur die beiden Arten *L. monocytogenes* und *L. ivanovii* als opportunistische Krankheitserreger bekannt. Während *L. ivanovii* ein relativ enges Wirtsspektrum im Tierbereich besitzt und vorwiegend Infektionen bei Wiederkäuern hervorruft, ist *L. monocytogenes* in der Lage, einen breiten Wirtskreis unter den Wirbeltieren und Menschen zu infizieren (Farber und Peterkin, 1991; Vazquez-Boland et al., 2001a). Die von *L. monocytogenes* hervorgerufene Krankheit wird als Listeriose bezeichnet. Die Gefahr einer Listeriose besteht hauptsächlich für immungeschwächte Personen, wie z.B. AIDS- oder Transplantationspatienten, ältere Menschen und Neugeborene. Eine Übertragung der ubiquitär vorkommenden Bakterien findet in der Regel durch den Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel statt. Über das Darmepithel gelangen die Listerien in den Blutkreislauf, von wo aus sie Leber, Milz und andere Organe infizieren können. Aufgrund der fakultativ intrazellulären Lebensweise von *L. monocytogenes* ist der Erreger befähigt, sowohl die Blut-Hirn-Schranke als auch die Plazentaschranke zu passieren und somit eine Hirnhautentzündung oder Gehirnentzündung (Meningitis, Enzephalitis) auszulösen als auch eine Schädigung des Embryos bzw. eine Fehlgeburt hervorzurufen (Gellin und Broome, 1989). Bei einer fortgeschrittenen Infektion führt die Listeriose trotz Antibiotikabehandlung in ca. 20-30% der Fälle zum Tod des Patienten (Schuchat et al., 1991; Rocourt und Brosch, 1992).

Als Lebensmittelkeim stellt *L. monocytogenes* durch seine Anpassung an extreme Umweltbedingungen ein großes Problem der Nahrungsmittelindustrie dar. So können sich die Bakterien auch unter Bedingungen vermehren, die im Allgemeinen für die Lagerung und Konservierung von Nahrungs- und Futtermitteln verwendet werden (hohe Salzkonzentrationen, niedrige Temperaturen, extreme pH-Bereiche, reduziertes Sauerstoffangebot). Es ist daher immer wieder zu epidemischen Ausbrüchen der Erkrankung in Nordamerika und Europa

gekommen, wodurch sich die Listeriose zunehmend zu einer Infektionskrankheit von allgemeinem Interesse entwickelt hat (Bille, J., 1990; Ryser, E.T., 1999).

L. monocytogenes gehört zu einem der am besten auf molekularem und zellulärem Level untersuchten intrazellulären Erregern und stellt nicht nur für die T-Zellimmunität, sondern auch für die Aktin-vermittelte Zellbewegung ein herausragendes Modellsystem dar. Die wichtigsten Komponenten des intrazellulären Infektionszyklus von *L. monocytogenes* sind bereits bekannt (Abb. 1.1), aber dennoch ist das Verständnis seiner Pathogenität noch immer unvollständig. Viele Details hinsichtlich der Interaktionen mit den Wirtszellen und der Anpassung der Bakterien an das intrazelluläre Milieu sind noch ungeklärt. Zur Entwicklung neuer Diagnoseverfahren für eine Listeriose und zur Identifizierung neuer Angriffsziele für die Entwicklung antimikrobieller Substanzen wäre ein detailliertes Wissen über die Funktion und Regulation der an der Infektion beteiligten Faktoren von Bedeutung. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten ebenfalls wesentliche Beiträge für die Pathogenitätsforschung anderer fakultativ intrazellulärer Bakterien, wie z.B. *Shigella ssp.*, *Yersinia ssp.*, *Salmonella ssp.* und *Neisseria ssp.*, leisten.

1.2. Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

L. monocytogenes ist in der Lage, sich sowohl in Makrophagen als auch in nicht-phagozytierenden Zellen wie Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten zu vermehren. In all diesen Zelllinien durchläuft *L. monocytogenes* einen charakteristischen Infektionszyklus, der erstmals von Tilney und Portnoy (1989) beschrieben wurde (Abb.1.1).

Der Infektionszyklus beginnt mit der Aufnahme der Bakterien in die Wirtszellen, wobei die Listerien bei den nicht-phagozytierenden Zelllinien ihre eigene Phagozytose mit Hilfe der beiden Oberflächenproteine Internalin A und Internalin B induzieren. Durch die spezifische Bindung der Internaline an bestimmte Wirtsproteine wird die Bildung von Membranausstülpungen eingeleitet, von denen die Bakterien schließlich vollständig umschlossen werden (Galliard et al., 1991; Lecuit et al., 1997; Braun et al., 1998). Die Listerien liegen daher zunächst in einer primären Vakuole im Zytoplasma der Wirtszellen vor, aus der sie sich durch die Sekretion des porenbildenden Hämolysins Listeriolysin (Hly) und der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PlcA) befreien (Geoffroy et al., 1987; Camilli et al., 1993). Frei im Zytoplasma vorliegend kommt es zunächst zu einer Vermehrung

der Listerien. Die intrazelluläre Fortbewegung der geißellosen Bakterien erfolgt mit Hilfe des Aktin-Nukleationsfaktors ActA. Dieses Oberflächenprotein ist in der Lage, verschiedene Komponenten der Aktinpolymerisationmaschinerie der Wirtszelle zur bakteriellen Oberfläche zu rekrutieren (Ireton und Cossart, 1997). Durch die Ausbildung sogenannter Aktinschweife an einem der beiden Zellpole können sich die Bakterien durch Abstoßeffekte aktiv durch das Zytoplasma bewegen (Chakraborty, T., 1996). Gelangen die Listerien an die Plasmamembran der Wirtszellen, kommt es zur Ausbildung von Zellfortsätzen, den sogenannten „Protrusions“. Diese werden wiederum von benachbarten Zellen durch Phagozytose aufgenommen, so dass die Listerien in den neu infizierten Zellen von einer Doppelmembran umgeben sind (sekundäre Vakuole). Um sich wieder frei im Zytoplasma vermehren zu können, sekretiert *L. monocytogenes* erneut Listeriolysin und zusätzlich die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PlcB), die zusammen eine Lyse der umgebenen Doppelmembran bewirken. PlcB, das als inaktives Enzym in den extrazellulären Raum sekretiert wird, muss jedoch zunächst durch die Prozessierung einer spezifischen Metalloprotease (Mpl) aktiviert werden (Marquis et al., 1995).

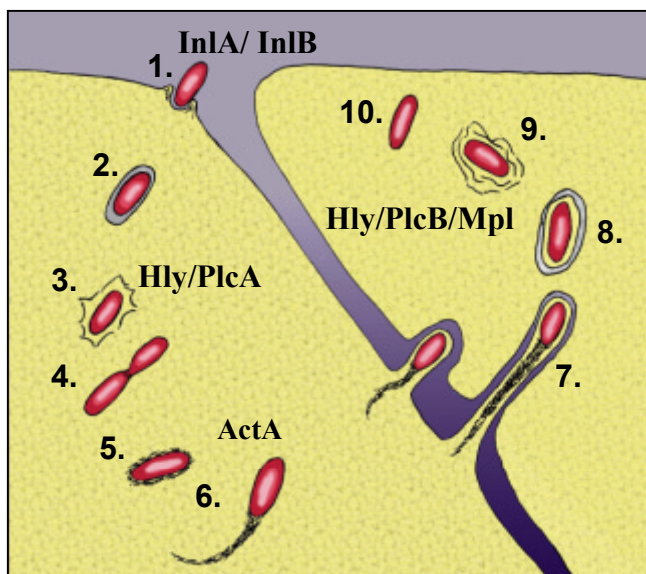


Abbildung 1. 1 : Infektionszyklus von *L. monocytogenes*.

1. Invasion der Listerien durch induzierte Phagozytose; 2. Kurzer Aufenthalt im Phagosom; 3. Lyse des primären Phagosoms; 4. Proliferation; 5. Rekrutierung von Aktinfilamenten; 6. Intrazelluläre Motilität mit Hilfe der Aktinschweife; 7. Infektion benachbarter Zellen durch die Ausbildung der sogenannten „Protrusions“; 8. Einschluss im sekundären Phagosom; 9. Entkommen aus dem sekundären Phagosom; 10. Wiederholung des Zyklus.

Die Abkürzungen (InlA, InlB, Hly, PlcA, ActA, Mpl, PlcB) stehen für spezifische Virulenzfaktoren, die bei den einzelnen Stationen von Bedeutung sind.

Auf diese Weise können die Bakterien eine Zelle nach der anderen infizieren und sich vor der humoralen Immunabwehr des Wirtsorganismus schützen. Eine Abwehr der Infektion in diesem Stadium ist nur noch durch die zellvermittelte Immunantwort möglich (Cossart und Bierne, 2001).

Die Gene, die für die Schlüsselfunktionen des intrazellulären Infektionszyklus von *L. monocytogenes* kodieren, sind in einem ca. 10 kb großen Gencluster auf dem Chromosom angeordnet (Vázquez-Boland et al., 2001b). Bei der apathogenen Spezies *L. innocua*, die am nächsten mit *L. monocytogenes* verwandt ist, ist dieses Virulenzgencluster nicht vorzufinden (Abb.1.2). Die Expression der Virulenzgene ist abhängig von PrfA, einem positiven Regulationsfaktor der Crp/Fnr-Familie (Chakraborty et al., 1992; Lampidis et al., 1994). PrfA bindet an eine palindromische Erkennungssequenz, der sogenannten „PrfA-Box“, die in der Promotor-Region der PrfA-abhängigen Gene lokalisiert ist. Der Regulationsfaktor wirkt autoregulatorisch und kann durch verschiedene Umweltbedingungen aktiviert werden, wie z.B. hohe Temperaturen (37°C) (Leihmeister-Wächter et al., 1992), Kontakt mit den Wirtszellen (Renzoni et al., 1999) und Stressbedingungen (Sokolovic et al., 1990), wie z.B. die Umstellung der Bakterienkultivierung von BHI („Brain Heart Infusion“) zu einem Minimal-Medium (Bohne et al., 1994).

Promotoren mit einer perfekten palindromischen Sequenz (z.B. *Phly*, *PplcA/prfA*) können effizienter durch PrfA reguliert werden als diejenigen mit einem „Nukleotid-Mismatch“, bei denen eine Aktivierung erst durch die Anwesenheit größerer PrfA-Mengen erfolgt (z.B. *Pmpl*, *PactA/plcB*). Dieser Regulationsmechanismus scheint entscheidend, für die zeitliche und räumliche Expression der Virulenzgene und somit für den korrekten Ablauf des intrazellulären Infektionszyklus von *L. monocytogenes* zu sein (Vázquez-Boland et al., 2001a).

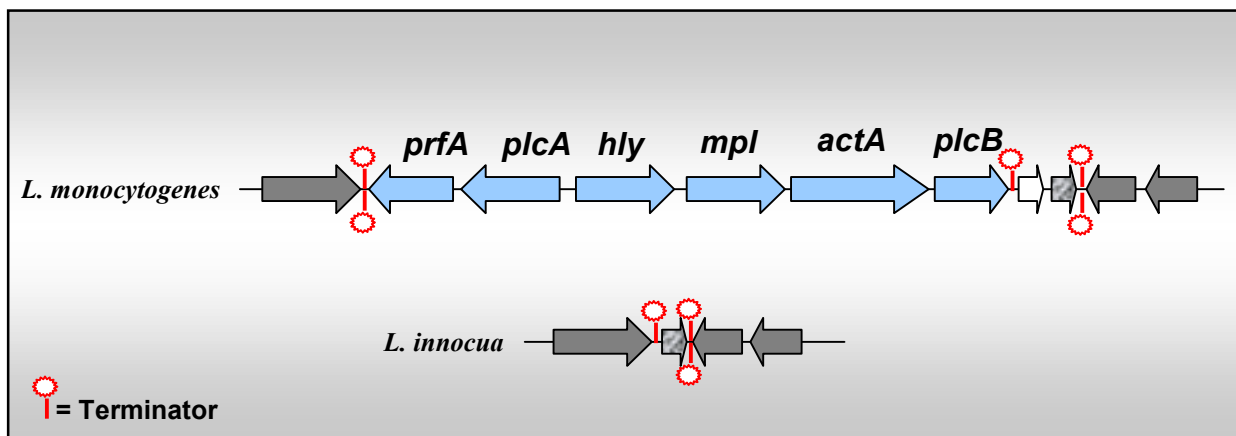


Abbildung 1.2 : Schematische Darstellung des zentralen Virulenzgenclusters von *L. monocytogenes* und die Struktur des entsprechenden Genlocus in der apathogenen Spezies *L. innocua*.

Die beiden Invasionsproteine InlA und InlB, deren kodierende Sequenzen gemeinsam in einem Operon an einer anderen Stelle auf dem Chromosom lokalisiert sind, stehen ebenfalls unter der Kontrolle von PrfA (Dramsi et al., 1993; Lingnau et al., 1995).

1.3. Bakterielle Membranproteine

Membranproteine sind an wichtigen funktionellen Prozessen der Zelle beteiligt. Sie sind für den Metabolit- und Ionentransport verantwortlich, übermitteln äußere Reize über die Signaltransduktion, stellen wichtige Komponenten des Energiestoffwechsels dar, führen zur Ausbildung von Antibiotikaresistenzen und sind für die Sekretion von Proteinen und Abfallprodukten zuständig. Auch bei der Virulenz der Bakterien kommt den Membranproteinen eine wichtige Bedeutung zu. Einige Membranproteine wirken als Adhäsine und ermöglichen den Erregern den spezifischen Kontakt zum Wirtsgewebe bzw. den Wirtszellen (Nougayrede et al., 2000). Selbst bei dem Aktin-Nukleationsfaktor ActA, einem der bestcharakterisierten Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*, handelt es sich um ein Membranprotein, das über seinen hydrophoben C-Terminus in der Lipiddoppelschicht verankert ist (Kocks et al., 1992).

Membranproteine können auf vielfältige Weise mit der Zellmembran verbunden sein. Generell unterscheidet man bei grampositiven Bakterien zwischen membranassoziierten und integralen Membranproteinen. Die membranassoziierten Proteine stehen funktionell mit der Zellmembran im Zusammenhang, gehen jedoch im Gegensatz zu den integralen Membranproteinen mit ihrer Aminosäuresequenz keine hydrophoben Wechselwirkungen mit der Lipiddoppelschicht ein. Sie werden meist über Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Membranproteinen in Position gehalten und können daher verhältnismäßig leicht von der Membran abgelöst werden. Zur Gruppe der membranassoziierten Proteine gehören unter anderem Enzyme des Lipidstoffwechsels, hydrophile Bestandteile verschiedener Transportsysteme, das an der Elektronentransportkette beteiligte Cytochrom *c* und auch die F₁-Untereinheit des ATP-Synthase-Komplexes.

Integrale Membranproteine zeichnen sich hingegen durch hydrophobe Bereiche innerhalb ihrer Aminosäuresequenz aus, mit denen sie sich entweder in der Membran einbetten oder diese sogar durchspannen können. Zur Durchspannung der Membran sind gewöhnlich 15-25 aufeinanderfolgende Aminosäuren mit hydrophoben bzw. unpolaren Resten notwendig (Santoni et al., 2000). Die Faltstruktur der Transmembrandomänen ist aufgrund der lipophilen Umgebung limitiert, so dass die innerhalb der Membran befindlichen Bereiche eines Membranproteins dort hauptsächlich in Form der α -Helix vorliegen (Fujiki et al., 1982). Eine Ausnahme hierbei bilden die Porine der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, deren Transmembrandomänen gewöhnlich β -Faltblattstrukturen ausbilden. Die Transmembrandomänen der Porine unterscheiden sich jedoch generell von denen der

α -helicalen Membranproteine, da sie sich nicht ausschließlich aus unpolaren, sondern abwechselnd aus polaren und unpolaren Aminosäureresten zusammensetzen und somit wesentlich hydrophiler sind (Santoni et al., 2000).

Die Genomsequenz von *L. monocytogenes* (EGD-e, Serotyp 1/2) wurde 2001 von Glaser et al. zusammen mit der Genomsequenz des apathogenen Stammes *L. innocua* CLIP11262 veröffentlicht. Insgesamt wurden für *L. monocytogenes* 2853 proteinkodierende Gene annotiert, von denen 695 Gene für Proteine mit einer oder mehreren Transmembrandomänen kodieren (Arai et al., 2003). Dieses entspricht einem Anteil von ca. 24,4% aller offenen Leserahmen. Neben einer großen Anzahl von Proteinen mit bisher unbekannter Funktion (334 Proteine) befinden sich vorwiegend Transportproteine (222 Proteine) unter den annotierten integralen Membranproteinen (Abb.1.3).

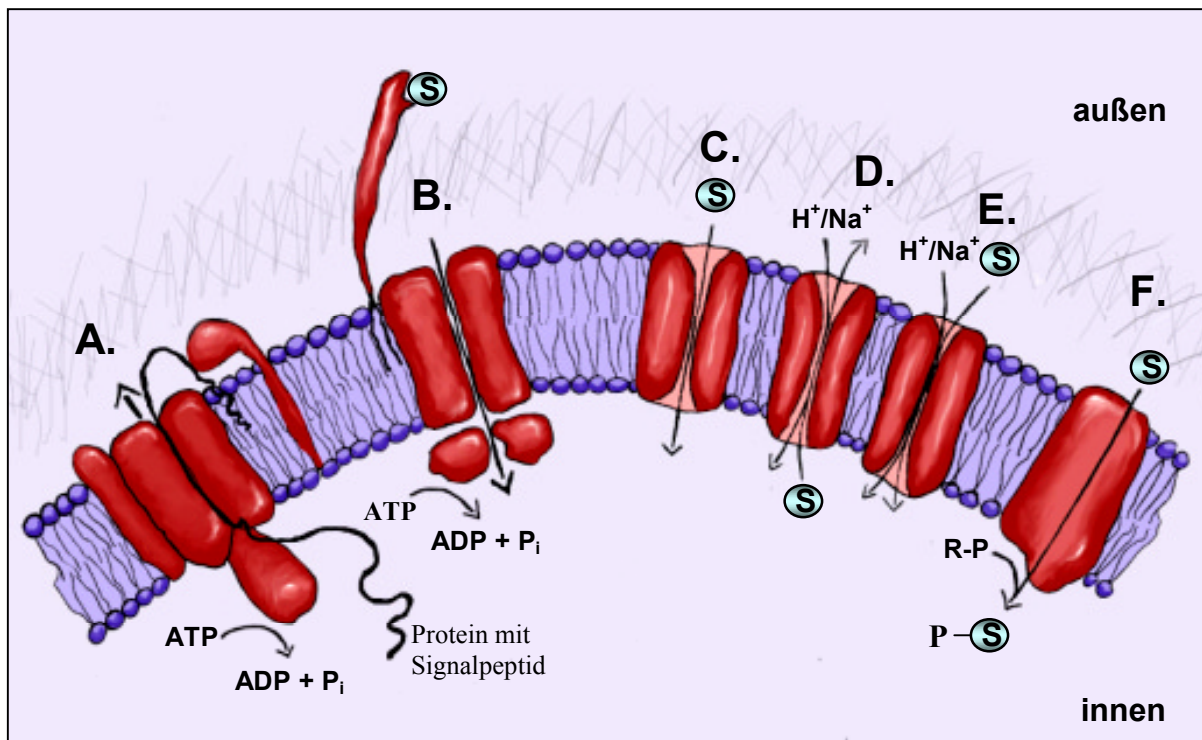


Abbildung 1.3 : Verschiedene Membrantransportsysteme grampositiver Bakterien. A. Sec-abhängiger Sekretionsapparat nach Tjalsma et al. (2000); B. ABC-(ATP-Binding-Cassette)-Importer. Die für den Transport erforderliche Energie stammt aus der Hydrolyse von ATP. (C-E) Sekundäre Transportsysteme unterteilt in C. Uniporter D. Antiporter E. Symporter. Der Transport erfolgt mit Hilfe der Energie der protonenmotorischen Kraft. F. Gruppentranslokation/Phosphotransferasesystem. Die Energie für den Transport stammt von Phosphoenolpyruvat, von dem ausgehend ein Phosphat kaskadenartig über die einzelnen Komponenten des Transportsystems auf die PTS-II-Permease übertragen wird. Letztere führt schließlich den Transport und die Phosphorylierung des Substrates (verschiedene Kohlehydrate) durch. (S) = Substrat.

Bei den Transportsystemen sind neben der großen Familie der ABC (ATP-Binding-Cassette)-Transporter die Phosphoenolpyruvat-abhängigen kohlenhydrattransportierenden Phosphotransferasesysteme (PTS) hervorzuheben. *L. monocytogenes* besitzt mit 39 vollständigen/unvollständigen PTS-II-Permeasen fast doppelt so viele wie *E. coli* und ungefähr dreimal so viele wie *B. subtilis* (Glaser et al., 2001). Für eine der β -Glucosid-spezifischen PTS-II-Komponenten (*bvrB*) wird angenommen, dass sie nicht nur eine Transportfunktion sondern ebenfalls eine signalvermittelnde Funktion besitzt und in Abhängigkeit von β -Glucosiden zu einer Repression der Virulenzgene führt (Brehm et al., 1999).

Während integrale Membranproteine aufgrund ihrer spezifischen hydrophoben Sequenzbereiche mit Hilfe von Gensequenzanalysen annotiert werden können, ist es bei den membranassoziierten Proteinen sehr schwierig, anhand von Gensequenzen bzw. Aminosäuresequenzen eine Vorhersage über die Membranzugehörigkeit zu treffen. Eine Ausnahme bildet dabei die Gruppe der Lipoproteine, die sich durch ihre spezifischen Signalsequenzen von den üblichen sekretorischen Proteinen unterscheiden.

1.4. Bakterielle Lipoproteine

Bei den Lipoproteinen handelt es sich um eine spezielle Gruppe von membranassoziierten Proteinen, die über eine Lipidmodifizierung in der Membran verankert sind. Sie zeichnen sich durch ihre spezifischen Signalsequenzen aus, die in der Regel etwas kürzer als die der klassischen sekretorischen Proteine sind. Das Charakteristische der Prälipoprotein-Signalsequenzen ist jedoch die hoch konservierte Konsensussequenz im C-terminalen Bereich der Signalsequenzen. Diese Konsensussequenz, die auch als Lipobox bezeichnet wird, besteht in der Regel aus den Aminosäuren Leucin₍₋₃₎-Alanin/Serin₍₋₂₎-Alanin/Glycin₍₋₁₎ und dem unabhömmlichen Cystein, das sich unmittelbar hinter der Schnittstelle des Signalpeptids befindet (von Heijne, G., 1989; Braun und Wu, 1994; Sutcliffe und Harrington, 2002).

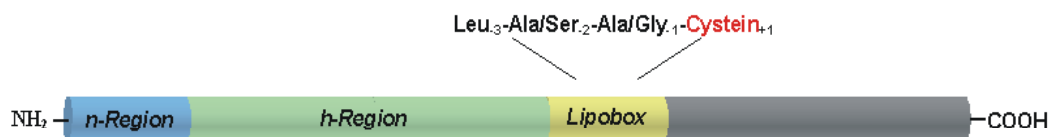


Abbildung 1.4 : Schematischer Aufbau eines Signalpeptids grampositiver Prälipoproteine. Die Signalpeptide grampositiver Prälipoproteine setzen sich aus drei unterschiedlichen Regionen zusammen: einer positiv geladenen N-terminalen Region (n-Region), einer zentralen hydrophoben Region (h-Region) und einer C-terminalen Konsensussequenz, der sogenannten Lipobox.

Der erste Schritt der Lipidmodifizierung wird durch die Prälipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase (Lgt) katalysiert. Wie man bereits aus dem Namen des Enzyms entnehmen kann, handelt es sich hierbei um eine Transferase, die einen Diacylglycerylrest von Glycerinphosphatiden auf die Sulfhydrylgruppe des in der Lipobox enthaltenen Cysteins überträgt (Sankaran und Wu, 1994). Im Anschluss an diese Modifizierung erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids durch die lipoproteinspezifische Signalpeptidase II (SPaseII). Die SPaseII trennt das Signalpeptid eine Position vor dem Cystein ab, so dass das lipid-modifizierte Cystein den N-Terminus des reifen Lipoproteins bildet. Bei gramnegativen Bakterien wird eine weitere Fettsäure durch die Lipoprotein-N-Acyl-Transferase (Lnt) an das endständige Cystein gebunden. Ein entsprechendes homologes Enzym konnte jedoch in den Genomen verschiedener grampositiver Bakterien, *L. monocytogenes* eingeschlossen, nicht gefunden werden (Tjalsma et al., 1999a; Réglier-Poupet et al., 2003; Fukuda et al., 2002).

Sowohl bei Lgt als auch bei der SPaseII handelt es sich um integrale Membranproteine. Die Lipoproteinbiosynthese findet daher an der Zellmembran statt.

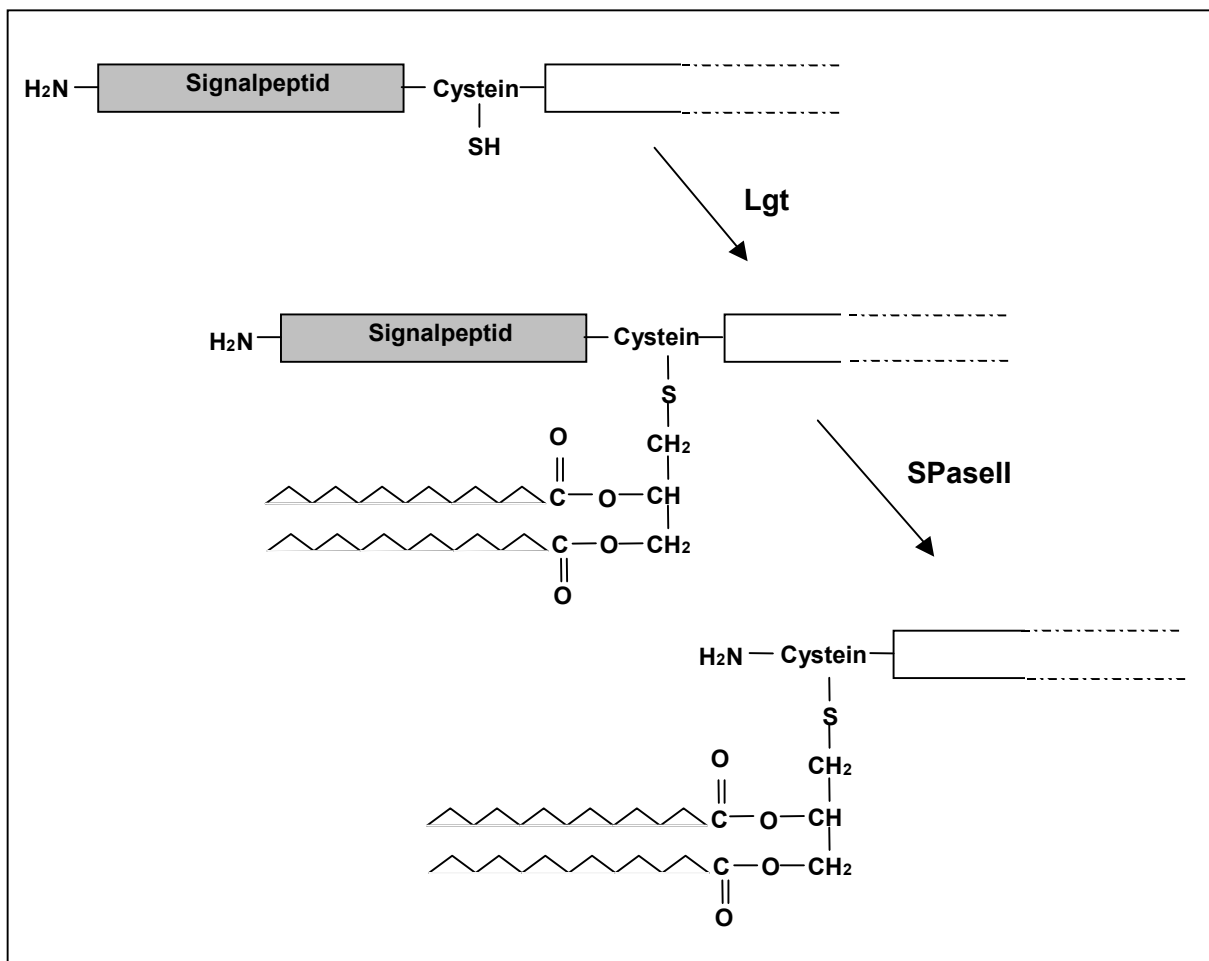


Abbildung 1.5 : Lipoproteinbiosynthese in grampositiven Bakterien (nach Sutcliffe et al., 2001).

Vor der Lipidmodifizierung werden die Prälipoproteine zunächst über den Sec-abhängigen Sekretionsapparat durch die Zellmembran transloziert (Sugai und Wu, 1992). Die Verankerung der Lipoproteine findet schließlich an der Außenseite der Membran statt, so dass die Lipoproteine auf der Oberfläche der Bakterien präsentiert sind.

Lipoproteine stellen mit ihren 68 putativen Kandidaten die größte Gruppe unter den insgesamt 133 vorhergesagten Oberflächenproteine von *L. monocytogenes* dar (Cabanès et al., 2002). Viele der lipidmodifizierten Proteine sind bei den grampositiven Bakterien als Substratbindungskomponenten mit ABC-Transportsystemen assoziiert (Abb.1.3) (Gilson et al., 1988). Hierbei zeichnen sie sich durch ihre hohe Affinität zum Substrat aus, wozu verschiedene Aminosäuren, Zucker, Polysaccharide, Peptide und anorganische Ionen gezählt werden (Higgins, C.F., 1992). Auch die Aufnahme verschiedener Eisenverbindungen erfolgt bei vielen pathogenen Bakterienarten über ABC-Transportsysteme (Brown und Holden, 2002). Da Eisen innerhalb des Wirtsgewebes in nur sehr geringen Mengen den Bakterien frei zur Verfügung steht, spielen effektive Eisenaufnahmesysteme eine wichtige Rolle bei der Ansiedlung und Vermehrung der Bakterien. Für *L. monocytogenes* konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Erreger verschiedene Verbindungen (Eisencitrat, Transferrin, Siderophore, Catecholamine) für seine Eisenversorgung nutzen kann, allerdings konnten die entsprechenden Transportsysteme bisher noch nicht näher charakterisiert werden (Vázquez-Boland et al., 2001; Brown und Holden, 2002). Nennenswert in diesem Zusammenhang sind jedoch die fünf von Glaser et al. (2001) annotierten Lipoproteine, die eine hohe Homologie zu Substratbindungskomponenten eisenspezifischer Transportsysteme aufweisen (Lmo0541, Lmo1073, Lmo1959, Lmo2184, Lmo2431).

Zudem existieren in der Literatur mehrere Beispiele, bei denen Lipoproteine an wichtigen Wirts-Pathogen-Interaktionen beteiligt sind. Bei der Gattung *Streptococcus* ist z.B. die Familie der LraI-Lipoproteine für die Adhäsion der Bakterien an Epithelzellen und anderen Wirtsoberflächen verantwortlich (Jenkinson, H.F., 1994; Elsner et al., 2002). Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung eines Lipoproteins an der Virulenz eines Pathogens stellt die Cu, Zn-Superoxiddismutase von *Mycobacterium tuberculosis* dar, für die eine wichtige Rolle bei der Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffprodukten und somit der Überlebensfähigkeit der Bakterien in phagozitierenden Zellen angenommen wird (D'Ozario et al., 2001). Zudem gibt es Beispiele, bei denen oligopeptidbindende Lipoproteine durch den Transport spezifischer oder unspezifischer Oligopeptide an der Signaltransduktion beteiligt sind (Monnet, V., 2003). Bei *B. cereus* und *B. thuringiensis* ist z.B. die Aktivierung des zentralen Virulenzregulators

PlcR abhängig von der Aufnahme spezifischer Peptide (PapR), die nachweislich über ein oligopeptidspezifisches ABC-Transportsystem erfolgt (Slamti und Lereclus, 2002).

Andere bakterielle Lipoproteine wirken wiederum als proinflammatorische Moleküle und können somit sowohl die immanente als auch die adaptive Immunantwort in Säugetieren initiieren (Aliprantis et al., 1999). Bei *L. monocytogenes* konnte bereits TcsA als putatives Lipoprotein mit CD4⁺T-Zellen-Aktivierung identifiziert werden (Sanderson et al., 1995).

Insgesamt konnten von Glaser et al. 68 putative Lipoproteine für *L. monocytogenes* annotiert werden. Dieses entspricht einem Anteil von ca. 2,4% aller proteinkodierenden Sequenzen und ist in etwa gleichzusetzen mit dem Lipoproteinanteil (2,8%) von *B. subtilis* (Antelmann et al., 2001). Die Gruppe der 68 Lipoproteine umschließt viele Kandidaten, die entweder aufgrund einer putativen PrfA-Box oder dem Fehlen eines Orthologs in der apathogen Spezies *L. innocua* interessante Kandidaten für neue Virulenzfaktoren darstellen. Eine detaillierte Analyse dieser Proteingruppe lag zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vor, so dass nur wenig über die listeriellen Lipoproteine und ihre Bedeutung im Infektionszyklus des intrazellulären Pathogens bekannt war.

1.5. Analyse von Membranproteinen

Mit der Sequenzierung zahlreicher prokaryotischer und eukaryotischer Genome (www.genomesonline.org, Kyrpides, N., 1999, Bernal et al., 2001) rücken effektive Methoden zur funktionellen Genomanalyse immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Während die Genomanalyse Informationen über die Anlagen und grundsätzlichen Fähigkeiten eines Organismus liefert, jedoch keinen Aufschluss über die dynamischen Prozesse innerhalb der Zellen geben kann, können mit Hilfe der Transkriptom- und der Proteomanalyse wertvolle Einblicke in das komplexe regulatorische Netzwerk der Zelle gewonnen werden. Die Transkriptomanalyse basiert auf mRNA-Untersuchungen und führt zur Aufklärung der Transkriptionsregulation in Abhängigkeit von verschiedenen Zellstadien, Geweben, Organismen und Umwelteinflüssen. Die Proteomforschung beschäftigt sich hingegen mit der systematischen Analyse des Proteoms, das die Gesamtheit aller von einem Genom exprimierten Proteine eines Organismus, einer Zelle oder einer Organelle in einem bestimmten Moment unter streng definierten Bedingungen darstellt (Lottspeich, F., 1999). Beide Methoden ergänzen sich. Sie liefern Ergebnisse mit unterschiedlichem Informationsgehalt, so dass sie nicht direkt

konkurrieren und keine der beiden Methoden die andere ersetzen kann. Seit der Etablierung der DNA-Array-Technologie besitzt die Transkriptomanalyse gegenüber der Proteomanalyse den Vorteil einer sehr schnellen und automatisierbaren Identifizierung aller zum Zeitpunkt der Probenentnahme transkribierten Gene. Die Transkriptomanalyse liefert jedoch stets nur indirekte Informationen über die der Zelle zur Verfügung stehenden Werkzeuge, den Proteinen, so dass die Proteomanalyse zum Verständnis der zellulären Vorgänge unverzichtbar ist. In den meisten Fällen korreliert die Anzahl der mRNA-Moleküle mit der Menge des dazugehörigen Proteins, allerdings muss dieses nicht zwangsläufig der Fall sein. So existieren beispielsweise posttranskriptionale Regulationsmechanismen, bei denen die Initiation der Translation durch die Bindung von Repressorproteinen an die mRNA verhindert wird (MacDonald, P., 2001). Weiterhin kann die Proteinmenge durch Degradationsprozesse oder durch eine unterschiedliche Stabilität der Proteine beeinflusst werden. Ein Protein, das eine hohe Stabilität aufweist, kann trotz geringem Transkriptionslevel in verhältnismäßig hoher Kopiezahl in der Zelle vorliegen. Auch die „Ein-Gen-ein-Polypeptid-Hypothese“ kann spätestens seit der Sequenzierung des menschlichen Genoms (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) nicht mehr aufrechterhalten werden. Aufgrund von ko- und posttranslationalen Modifizierungen können auch bei den Prokaryoten mehrere Genprodukte pro Gen auftreten. Bei *E. coli* wird z.B. ein Durchschnitt von 1,3 Genprodukten pro Gen erwartet (Gooley und Packer, 1997).

Mit Hilfe von Subproteomanalysen ist es zudem möglich, die Lokalisation der Proteine in der Zelle zu bestimmen, welches durch Genom- oder Transkriptomanalysen nicht möglich ist oder nur vermutet werden kann.

Die Standardmethode heutiger Proteomanalysen basiert auf der von O'Farrell 1975 entwickelten hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-Gele), die im Laufe der Jahre immer weiterentwickelt wurde und mit der Einführung der immobilisierten pH-Gradienten (Bjellqvist et al., 1982, Righetti, P.G., 1990) entscheidende Fortschritte in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erlangt hat. Die 2D-Gelelektrophorese ermöglicht eine parallele Auftrennung von bis zu 10.000 verschiedener Proteinspots (Gauss et al., 1999; Klose, J., 1999), die anschließend mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen, wie z.B. dem Peptidmassenfingerprintverfahren, identifiziert werden können. Ein großer Teil eines jeden Proteoms, insbesondere die Gruppe basischer oder niedrig exprimierter Proteine, bleibt dennoch mit Hilfe dieses Verfahrens nicht darstellbar oder benötigt selektive und aufwendige Vorfraktionierungen, um für die 2D-Analyse zugänglich zu werden.

Die Analyse von Membranproteinen stellt heutzutage eine der größten Herausforderungen der Proteomanalyse dar. Dieses ist zum einen darauf zurückzuführen, dass Membranproteine in der

Regel in relativ geringer Kopiezahl in der Zelle vorliegen und für die Analyse von niedrig exprimierten Proteinen zunächst sehr spezielle und aufwendige Vorfraktionierungen etabliert werden müssen. Das weitaus größere Problem bei der Analyse der Membranproteine steht jedoch im Zusammenhang mit dem hydrophoben Charakter dieser Proteinfraction. Viele der integralen Membranproteine lassen sich entweder gar nicht oder nur unzureichend mit den Detergenzien, die mit der isoelektrischen Fokussierung kompatibel sind, in Lösung bringen. Auch wenn zunächst die Solubilisierung einiger Membranproteine erreicht werden sollte, kommt es häufig zur Präzipitation der Proteine im Bereich ihres isoelektrischen Punktes. Dieses führt entweder zu horizontalen Streifen im 2D-Gel oder zum Verlust des Proteins, da der Transfer von der ersten auf die zweite Dimension durch die Präzipitation verhindert wird (Hartinger et al., 1996; Mastro und Hall, 1999). In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen, um die Löslichkeitsprobleme, die bei der isoelektrischen Fokussierung hydrophober Proteine bestehen, zu beheben. Doch trotz der Entwicklung neuer Reagenzien mit verstärkter Solubilisierungskraft (z.B. Sulfobetaine, Tributylphosphine) und des Einsatzes von Thioharnstoff bleibt die Auftrennung integraler Membranproteine über die 2D-Gelelektrophorese mit Ausnahme der Porine der gramnegativen Bakterien weitgehend limitiert (Molloy, M. P., 2000; Santoni et al., 2000).

In den letzten Jahren wurde daher immer mehr auf alternative Verfahren zur Analyse von integralen Membranproteinen zurückgegriffen. Zu diesen Verfahren gehört zum Beispiel die 16BAC/SDS-Gelelektrophorese, die ursprünglich von Macfarlane et al. (1989) entwickelt wurde und von Hartinger et al. (1996) zum ersten Mal speziell für die Analyse hydrophober Proteine eingesetzt wurde. Bei diesem Verfahren handelt es sich ebenfalls um eine zweidimensionale Gelelektrophorese, bei der die Proteine jedoch in beiden Dimensionen gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch die Kombination eines „inversen“ Elektrophoresesystems mit dem kationischen Detergens 16BAC in der ersten Dimension und einer SDS-PAGE in der zweiten Dimension kann bei diesem Verfahren eine Auftrennung der Proteine in einzelne Proteinspots erzielt werden. Ein weiteres Verfahren, das für die Untersuchung von Membranproteinen eingesetzt werden kann, ist die Blau-native/SDS-Gelelektrophorese. Hierbei handelt es sich um eine Kombination aus einer nativen und einer denaturierenden Gelelektrophoresetechnik, die es sogar ermöglicht, Membranproteine im Komplex mit hydrophilen Komponenten nachzuweisen (Schägger und von Jagow, 1991; Brookes et al., 2002).

Seit kurzer Zeit werden zusätzlich zu den gelbasierenden Verfahren verstärkt gellose Technologien mittels einer Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) zur Analyse der integralen Membranproteine angewendet (Wu et al., 2003; Wu und Yates, 2003; Blonder et al., 2004). Obwohl bei diesen Verfahren ebenfalls einige Probleme hinsichtlich der Hydrophobizität der integralen Membranproteine bestehen, konnte mit Hilfe der gellosen Methoden zum ersten Mal mehr als 100 integrale Membranproteine parallel in einer Proteinfraction nachgewiesen werden (Washburn et al., 2001). Auch eine Kombination aus SDS-Gel und LC-MS/MS-Analyse bietet sich für die Analyse hydrophober Proteine an (Simpson et al., 2000; Zhao et al., 2004).

Trotz dieser alternativen Verfahren steht die Subproteomanalyse der Membranen sowohl bei den Prokaryoten als auch bei den Eukaryoten noch am Beginn der Untersuchungen. Die hydrophoben Proteine sind in den Proteomdatensätzen verschiedener Organismen immer noch deutlich unterrepräsentiert, obwohl ca. 20-30% aller offenen Leserahmen für Proteine mit einer oder mehreren putativen Transmembrandomänen kodieren (Santoni et al., 2000; Arai et al., 2003). Auch bei *L. monocytogenes* beschränkten sich die bisherigen Proteomanalysen auf zytoplasmatische, sekretorische oder lösliche Oberflächenproteine (Phan-Thau und Gormon, 1995 und 1997; Hebraud und Guzzo, 2000; Duche et al., 2002; Lenz et al., 2002).

Eine Charakterisierung der Hauptproteinkomponenten der listeriellen Membran existiert noch nicht. Aufgrund der Genomsequenzen können bislang lediglich Spekulationen über die Expression und Funktion der verschiedenen Transportmechanismen angestellt werden und so kann nicht eindeutig geklärt werden, ob z.B. eines der putativen eisenspezifischen ABC-Transportsysteme gebildet wird oder nicht. Sicher ist allerdings, dass die Präsenz verschiedener Transportmechanismen mit der Fähigkeit von *L. monocytogenes* korreliert, sich sowohl in den Wirtszellen als auch unter extremen Umweltbedingungen außerhalb der Wirtszellen replizieren zu können.

1.6. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse integraler Membranproteine und membranassoziierter Proteine des fakultativ intrazellulären Erregers *L. monocytogenes*. Dazu sollte zunächst ein geeignetes Protokoll zur Anreicherung der Membranproteine etabliert werden und anschließend unter Verwendung alternativer Trennverfahren eine Analyse des Membransubproteoms durchgeführt werden. Durch die Analyse der Hauptproteinkomponenten der listeriellen Membran sollten insbesondere Informationen hinsichtlich der verschiedenen Transportsysteme gewonnen werden, die im engen Zusammenhang mit der spezifischen Anpassungsfähigkeit des Pathogens an verschiedenste Lebensräume stehen.

Lipoproteine, die spezifisch mit der Membran assoziiert sind, und die umfangreichste Gruppe des listeriellen Oberflächenproteoms darstellen, sollten im weiteren Verlauf der Arbeit einer detaillierten Analyse unterzogen werden. Dabei sollten die dominantesten Lipoproteine der listeriellen Zellmembran zunächst identifiziert und experimentell verifiziert werden. Weiterhin sollte die Rolle der Lipoproteine an dem Infektionszyklus des intrazellulären Pathogens untersucht werden. Mit Hilfe vergleichender Expressionsanalysen unterschiedlich PrfA-exprimierender Stämme sollten für die genannten Fraktionen Proteine und gegebenenfalls funktionelle Einheiten identifiziert werden, die zum PrfA-Regulon gehören bzw. funktionell durch dieses moduliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeine Materialien und Chemikalien

Die Chemikalien wurden soweit nicht anders erwähnt von den folgenden Herstellern in analysenreiner Qualität (p.A) bezogen: Baker; Biomol; Fluka; Merck; Roche; Roth; Serva; Sigma . Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser, welches mit einem Milli-Q-System (Millipore) aufbereitet wurde, angesetzt.

2.2. Allgemeine Puffer

PBS („Phosphate buffered saline”)

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄

TBS („Tris buffered saline”) (pH 7,5)

20 mM Tris-Base
137 mM NaCl

2.3. Kultivierung von Bakterien

2.3.1. Bakterienstämme

Listeria monocytogenes EGD Wildtyp, Serotyp 1/2a

Deletionsmutanten:

Stamm *L.m.* EGD: $\Delta prfA$
Stamm *L.m.* EGD: Δlgt^*
Stamm *L.m.* EGD: $\Delta prfA/\Delta lgt^*$

Komplementierte Mutante:

Stamm *L.m.* EGD: Δlgt Liga157(*lgt*)*

Transformierte Stämme:

Stamm *L.m.* EGD: Liga 157*
Stamm *L.m.* EGD: Δlgt Liga157*
Stamm *L.m.* EGD: Δlgt Liga160(*prfA* 7973)*
Stamm *L.m.* EGD: Δlgt Liga155*
Stamm *L.m.* EGD: $\Delta prfA/\Delta lgt$ Liga155*

Alle mit * markierte Mutanten und transformierte Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die Stammkulturen wurden aus einer 750µl BHI-Übernachtskultur mit 250µl Glycerin hergestellt und bei –80°C gelagert.

Escherichia coli TG2 (Stratagene)

Escherichia coli TOP10 (TOPO One shot® chemisch kompetente Zellen, Invitrogen)

2.3.2. Kulturmedien und Zusätze

Alle Medien für die Bakterienkultur wurden durch Autoklavieren (30min, 121°C) sterilisiert. Hitzeempfindliche Medienkomponenten und Zusätze wurden sterilfiltriert und zum autoklavierten Medium hinzugefügt.

BHI-Medium („Brain-Heart-Infusion“)

3,7% (w/v) BHI
filtriert (10kD Ausschlussvolumen)

LB- Medium („Luria Bertani broth“)

1% (w/v) Bacto- Trypton
0,5% (w/v) Bacto- Hefeextrakt
120 mM NaCl

BHI-Agarplatten

0,16% (w/v) Bacto-Agar
3,7% (w/v) BHI

LB- Agarplatten

0,16% (w/v) Bacto- Agar
1% (w/v) Bacto- Trypton
0,5% (w/v) Bacto- Hefeextrakt
120 mM NaCl

SOC-Medium

2% (w/v) Bacto-Trypton
0,5% (w/v) Bacto-Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose

} extra
autoklaviert

SOB- Medium

2% (w/v) Bacto-Trypton
0,5% (w/v) Bacto-Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl

Minimal-Medium (immer frisch angesetzt)

116 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	24 mM	Thioctinsäure
48 mM	KH ₂ PO ₄	0,06% (w/v)	L-Gutamin
0,17 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01% (w/v)	L-Cystein HCl
0,33 µM	Eisencitrat	0,01% (w/v)	DL-Valin
2,05 nM	Biotin	0,01% (w/v)	DL-Methionin
13,3 nM	Rivoflavin	0,01% (w/v)	L-Arginin HCL
2,96 nM	Thiamin HCL	0,01% (w/v)	DL-Isoleucin
		0,01% (w/v)	L-Leucin

Antibiotikazusätze

Ampicillin: 100mg Ampicillin wurden in 1ml bidestilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Eingesetzte Konzentration = 200µg/ml.

Erythromycin: 50mg Erythromycin wurden in 10ml 70% (v/v) Ethanol gelöst und bei 4°C bis zu einem Monat gelagert. Eingesetzte Konzentration bei *E. coli* = 300µg/ml und bei *L. monocytogenes* 5µg/ml

Kanamycin: 10mg Kanamycin wurde in 1ml bidestilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C bis zu einem Monat gelagert. Eingesetzte Konzentration 50µg/ml.

Globomycin: 20mg Globomycin (Sankyo Co.,Tokyo) wurde in 1ml 70% (v/v) Ethanol gelöst und sofort in der Konzentration 100µg/ml eingesetzt.

2.3.3. Kulturbedingungen

Listerien wurden von einer tiefgefrorenen Stammlösung auf eine Agarplatte überimpft, bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert und bei 4°C aufbewahrt. Um eine Flüssigkultur anzupflanzen, wurde jeweils eine Kolonie mit Hilfe einer Impföse von der Agarplatte gepickt und in das neue Medium überführt. Die Kultivierung der Bakteriensuspension erfolgte entweder in BHI oder in Minimal-Medium bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator (Multitron, Infors). Für die Anzucht im Minimal-Medium wurden die Bakterien zunächst in 50ml BHI über Nacht angezogen, bei 3300xg pelletiert und in 50ml Minimal-Medium resuspendiert. Um die Listerien an das neue Medium zu adaptieren, wurde die Suspension für weitere 4 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert, erneut abzentrifugiert und in 50ml Minimal-Medium aufgenommen. Die adaptierte Bakteriensuspension wurde schließlich zum Animpfen der Hauptkultur verwendet, wobei eine Ausgangs-OD₆₀₀ von 0,05-0,1 eingestellt

wurde. Die Bestimmung der optischen Dichte der Kultur erfolgte mit dem Spectronic 20 Genesys Photometer der Firma Spectronic Instruments.

Die Kultivierung der *E. coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator.

2.4. Kultivierung von Gewebezellen

Verwendete Zelllinien

3T3 (Mausfibroblastenzelllinie), (ACC 173)

CACO-2 (Humane Darmepithelzellen), (ACC 169)

.

Wachstumsmedium

DMEM („Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium“) mit 1000mg/ml Glukose (Gibco BRL), 10% (v/v) FCS („Fötales Kälber Serum“, Gibco BRL), 2mM L-Glutamin (Flow-Laboratories).

Beide Zelllinien wurden von 10ml Wachstumsmedium überschichtet in 10cm Corning®-Petrischalen (Nunc) im Brutschrank (Former Scientific) bei 37°C in einer 7%igen (v/v) CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zur Passage wurden die Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL) solange behandelt, bis sich die Mehrzahl der Zellen sichtbar abrundete. Anschließend wurden sie mit einer Pipette abgespült, mit frischem vorgewärmten Medium verdünnt und in neuen Kulturschalen ausgesät.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Thomakammer (0,1mm x 0,0025mm²).

2.5. Herstellung von Proteinextrakten

2.5.1. Gesamtzellextrakt

Zur Herstellung eines Gesamtzellextraktes wurden 50ml einer Übernachtskultur in BHI bei 3000xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 10ml bidestilliertem Wasser unter Zugabe eines Proteinaseinhibitors (CompleteTM Mini, Roche) resuspendiert. Die Bakterien wurden durch dreimalige Behandlung mit der vorgekühlten French Press-Zelle des

Typs Sim Aminco von Spectronic Instruments bei einem Druck von 1000 psi aufgeschlossen und die Proteine anschließend durch TCA-Acetonbehandlung gefällt (s. Kapitel 2.5.6.).

2.5.2. Extrakte sekretorischer Proteine

300-500ml einer Listerienkultur (BHI oder Minimal-Medium) wurden kurz vor dem Eintreten in die stationäre Wachstumsphase durch zehnminütige Zentrifugation bei 3000xg und 37°C pelletiert und der Überstand mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße 0,2µm) von eventuell verbliebenen Bakterienzellen befreit. Die sekretorischen Proteine wurden mittels einer TCA-Acetonbehandlung direkt aus dem Überstand gefällt.

2.5.3. Extraktion von Membranproteinen durch differentielle Zentrifugation

Listerien wurden in 500ml Flüssigkultur (BHI) bis zu einer gewünschten Zelldichte angezogen und für 10 Minuten bei 3000xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, in 15ml bidestilliertem Wasser (+1Tablette CompleteTM Mini) resuspendiert und durch dreimalige Behandlung mit einer vorgekühlten French Press-Zelle aufgeschlossen. Zur Entfernung von Zellbruchstücken und restlichen Bakterienzellen wurde die Suspension bei 10.000xg und 4°C zentrifugiert. Die in dem Überstand enthaltenden Membranen bzw. Membranbruchstücke wurden schließlich durch einstündige Ultrazentrifugation bei 100.000xg und 4°C pelletiert. Das Membranpellet wurde direkt in SDS-Puffer (s. Kapitel 2.6.1.) aufgenommen.

2.5.4. Extraktion von Membranproteinen unter ribosomenstabilisierenden Bedingungen

500ml einer Listerienflüssigkultur (BHI oder Minimal-Medium) wurden bis zu einer gewünschten Zelldichte angezogen und für 10 Minuten bei 3000xg und 4°C zentrifugiert. Nach dem Waschen des Zellpellets in PBS wurden die Bakterien in 13ml des Ribosomenstabilisierenden Probenpuffers aufgenommen und mit 1,5 Tabletten CompleteTM Mini, EDTA-free (Roche) sowie 2µl Benzonase (Merck) versetzt. Letzteres diente einer schnellen Degradation der bei dem Zellaufschluß in großen Mengen freigesetzten DNA. Die Bakterien wurden durch dreimalige Behandlung mit einer vorgekühlten French Press-Zelle aufgeschlossen und bei 10.000xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Zur Isolation der Zellmembranen aus dem Überstand wurde eine Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu wurde die Probe auf je zwei Gradienten aufgeteilt und wie in der Abbildung 2.1 im Gradienten angeordnet. Die Ultrazentrifugation wurde für 45 Minuten bei 100.000xg durchgeführt und die deutlich erkennbaren Membranbanden mit einer Pasteurpipette vorsichtig entnommen. Nach der Vereinigung der beiden Membranbanden einer Probe und ihrer Überführung in ein neues Zentrifugationsröhrchen wurde dieses bis zum Rand mit bisdestilliertem Wasser aufgefüllt und die Membranen für eine Stunde bei 100.000xg pelletiert.

Um das Membranpellet von zytoplasmatischen Verunreinigungen zu befreien, wurden verschiedene Waschschriffe durchgeführt. Zunächst wurde das Pellet in 1M Tris/HCL pH=7,5 aufgenommen und für die Dauer von 30 Minuten inkubiert, dann folgte eine zweimalige Behandlung mit 0,1M Natriumcarbonat (ph=11) für je 1 Stunde und schließlich ein Waschschriff mit bidestilliertem Wasser. Zum Schutz vor Proteinaseaktivität wurde zu jeder Waschlösung Proteasehemmer in Form von CompleteTM Mini, EDTA-free (1Tablette/10ml) hinzugefügt. Nach jedem Waschschriff wurden die Membranen zunächst für 5 Minuten in ein Ultraschallbad („Sonorex Super 10P“, Bandelin) gestellt und nach der entsprechenden Inkubationszeit durch eine zwanzigminütige Ultrazentrifugation bei 104.300xg in einer Mini-Ultrazentrifuge erneut pelletiert. Alle Schritte nach dem Zellausschluß wurden bei 4°C durchgeführt. Das Pellet wurde entweder direkt in SDS-Probenpuffer (s. Kapitel 2.6.1), 16BAC-Probenpuffer(s. Kapitel 2.6.3) oder für die LC-MS/MS-Untersuchungen direkt mit einer Protease (s. Kapitel 2.10.3) behandelt.

Ribosomenstabilisierungspuffer (RB-Puffer)

5 mM	Magnesium-Acetat
100 mM	Kalium-Acetat
50 mM	HEPES pH=7,5
0,005% (v/v)	β -Mercaptoethanol

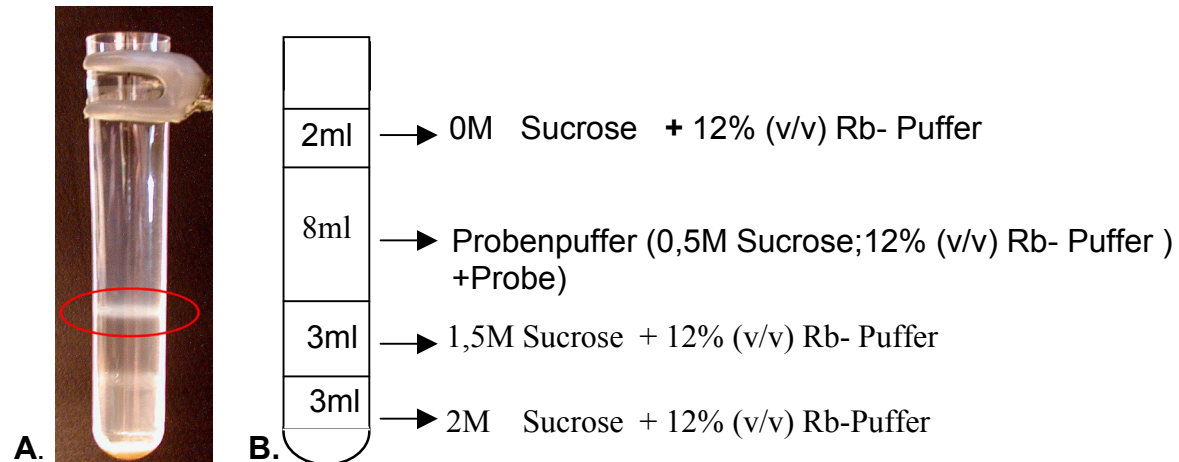


Abbildung 2.1 : Isolation von Membranen mit Hilfe der Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation. A. Sucrosedichtegradient nach der Zentrifugation mit deutlich erkennbarer, rot markierter Membranbande. B. Aufbau eines Sucrosedichtegradienten

2.5.5. Radioaktiv markierte Lipoproteinextrakte

Zur radioaktiven Markierung von Lipoproteinen wurden zunächst 10ml BHI oder Minimal-Medium mit einer Vorkultur von *L. monocytogenes* angeimpft und auf eine Ausgangs-OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Die Kultur wurde mit 250 μ Ci ³H-Palmitinsäure (Amersham Bioscience) versetzt, bei 37°C bis zum Erreichen der stationären Phase im Schüttelinkubator angezogen und anschließend bei 3000xg und 37°C für 10 Minuten pelletiert. Nach einem PBS-Waschschritt wurde das Pellet in 7,5ml Protoplastenpuffer aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im folgenden Schritt wurden die regenerierten Protoplasten mit 7,5ml bidestilliertem Wasser und einer Tablette Complete™ Mini, EDTA free vermengt, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Potters aufgeschlossen. Die Suspension wurde durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 10000xg und 4°C von Zelltrümmern und verbliebenen Bakterien befreit und der Überstand erneut für 20 Minuten bei 5000xg und 4°C zentrifugiert.

Um die Proteine aus den pelletierten Membranfragmenten zu isolieren, wurde eine Chloroform/Methanol-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde das Pellet in 2ml bidestilliertem Wasser resuspendiert und mit 4ml Methanol, 1ml Chloroform und schließlich mit 3ml bidestilliertem Wasser versetzt, wobei die Probe nach jedem Schritt für ca. 2 Minuten gevortext wurde. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe für 30 Minuten bei 3500xg und bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol aufgenommen.

2.5.6. TCA-Acetonfällung

Um die Proteinextrakte von Salz- und Detergenzrückständen zu befreien, wurde eine Proteinfällung durchgeführt. Die Extrakte wurden mit 0,02% (w/v) Natriumdesoxycholat versetzt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1/5 des Volumens einer 30%igen TCA-Lösung wurden die Proteine durch eine zweistündige Inkubation bei 4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 1 Stunde bei 5000xg und 4°C pelletiert. Für die anschließende Acetonfällung wurde das Pellet je nach Größe in 1-10ml bidestilliertem Wasser resuspendiert und mit dem fünffachen Volumen an eiskaltem Aceton versetzt. Es folgte die Inkubation der Proben bei -20°C für mindestens 2 Stunden und schließlich eine einstündige Zentrifugation bei 3500xg und 4°C. Die sich im Pellet befindlichen präzipitierten Proteine wurden entweder im SDS-Probenpuffer oder in der Quelllösung (s. Kapitel 2.6.2.1) aufgenommen.

2.5.7. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Extrakte erfolgte nach der von M. Bradford im Jahre 1976 beschriebenen Methode, welche auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie brilliant blue G-250 bei der Bindung an Proteine basiert. Hierzu wurden geeignete Verdünnungen der Probe in einem Volumen von 3x10 μ l in eine Mikrotiterplatte vorgelegt und mit jeweils 200 μ l Bradfordreagenz („Bio-Rad Protein Assay“, 1:5 mit bidestilliertem Wasser verdünnt) vermischt. Parallel wurde eine Standardreihe mit BSA in den Konzentrationen 0-1mg/ml auf dieselbe Weise angelegt.

Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde schließlich die Absorption der Lösungen bei einer Wellenlänge von 595nm mit Hilfe des ELISA-Readers Spectra Max 250 von MWG-Biotech gemessen. Zur Auswertung der Daten wurde die Software SoftMaxTMPro (Molecular Devices Corporation) herangezogen.

2.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) wurde zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht verwendet.

Nach Anlagerung des anionischen Detergens Sodium-Dodecylsulfat wandern die denaturierten Proteine im elektrischen Feld in Richtung der positiven Elektrode. In bestimmten Bereichen verhält sich die Wandergeschwindigkeit der Proteine annähernd umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde das ProteanTM II System von Biorad (16 x 18 x 1cm) und das Minigel-System von Biometra (65 x 85 x 0,5cm) verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer vermengt und für 5 Minuten bei 95°C unter Schütteln inkubiert. Als Molekulargewichtsmarker dienten der „Protein Ladder, 10-200 kDa“ und der vorgefärbte „Prestained Protein Ladder, ~10-180 kDa“ von Fermentas.

Die Fokussierung der Proben im Sammelgel wurde bei dem Minigel-System bei einer Spannung von 120V durchgeführt, die beim Übertreten der Lauffront in das Trenngel auf 180V erhöht wurde. Die Elektrophorese in dem ProteanTM II System erfolgte bei 70 V und 20°C über Nacht.

Puffer A

1,5 M Tris/HCL, pH=8,8
0,4% (w/v) SDS

Puffer B

0,5 M Tris/HCL, pH=8,8
0,4% (w/v) SDS

Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30 (Roth))

30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) N,N- Methylenebisacrylamid

Gellösungen für 12% SDS-Gele (ca. 7 Minigele /1 Proteangel)

	<u>Sammelgel (5%)</u>	<u>Trenngel (12%)</u>
bidest Wasser	10 ml	16 ml
Acrylamidlösung	1,7 ml	19,2 ml
Puffer A	-	12 ml
Puffer B	3,75 ml	-
10% (w/v) APS	120 µl	240 µl
TEMED	30 µl	50 µl

SDS-Probenpuffer (2x)

4% (w/v)	SDS
20% (v/v)	87% Glycerin
120mM	Tris/HCL, pH=6,8
5% (v/v)	2-Mercaptoethanol
0,25%(w/v)	Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer

25 mM	Tris-Base
192 mM	Glycin
0,1% (w/v)	SDS

2.6.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von hydrophilen Proteinextrakten von *L. monocytogenes* wurde die zweidimensionalen Gelelektrophorese nach O'Farrell (1975) angewandt. Bei dieser Methode wird ein Proteingemisch aufgrund zwei voneinander unabhängiger Kriterien getrennt. In der ersten Dimension werden die Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punktes getrennt, während in der zweiten Dimension eine Auftrennung gemäß ihres Molekulargewichts erfolgt.

Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Bei der isoelektrischen Fokussierung wandern die Proteine im elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten bis zu dem Punkt, an dem ihre Nettoladung gleich null ist. Dies ist der sogenannte isoelektrische Punkt (pI), der für jedes Protein charakteristisch ist.

Die IEF wurde mittels immobilisierten pH-Gradienten (Bjellqvist et al., 1982; Righetti, 1990) durchgeführt, wobei kommerziell erhältliche IPG-Streifen (Immobiline DryStrips, 18cm) mit unterschiedlichen pH-Bereichen von der Firma Amersham Bioscience verwendet wurden.

Durch den Einsatz des IPGphor-Elektrophoresesystem (Amersham Bioscience) war es möglich, Rehydratisierung und Fokussierung der Probe in derselben Kammer durchzuführen (Choe und Lee, 2000).

Das gefällte Proteingemisch wurde zunächst in Quell-Lösung aufgenommen und zur Entfernung ungelöster Bestandteile 20 Minuten bei 100.000xg zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben auf ein Endvolumen von 100-500µg Gesamtprotein/360µl Quell-Lösung eingestellt und mit 0,5% IPG- Puffer und etwas Bromphenolblaulösung zur Kontrolle der Probenmigration versetzt. Das Einquellen der Proteinprobe erfolgte schon während der Rehydratisierung der IPG-Streifen in den IPG Strip Holdern (Rabilloud et al., 1994). Die Elektronendrähte der gereinigten und mit Repel-Silane behandelten IPG Strip Holder wurden hierzu mit dünnen Filterpapierplättchen abgedeckt und mit je 20µl Quell-Lösung angefeuchtet. Anschließend wurde die Probe gleichmäßig in dem Strip Holder verteilt und ein IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten aufgelegt. Zum Schutz vor Verdunstung wurde der Streifen mit Silikonöl überschichtet.

Während der isoelektrischen Fokussierung wurde die Spannung kontinuierlich gesteigert, wobei die Stromstärke auf 45µA pro IPG-Streifen limitiert wurde:

Schritt	Zeit (h)	Spannung (V)	Programm
Rehydration	4	0	Step-n-hold
1	10	30	Step-n-hold
2	3	300	Gradient
3	6	3000	Gradient
4	3	5500	Gradient
5	∞	5500	Step-n-hold
6	0,5	8000	Gradient

Kurz vor Beendigung der Fokussierung wurde der Gradient für eine halbe Stunde auf 8000V erhöht (siehe Schritt Nr.6). Die Gesamtvoltstundenzahl betrug 100.000-120.000 Vh.

Quell-Lösung

Bei der Herstellung der Quell-Lösung wurden zunächst 10ml einer 9 molaren Harnstofflösung mit Serdolit MB-1-Ionenaustauscher (Serva) versetzt und nach 10 Minuten über einen Faltenfilter gegeben. Anschließend wurden die folgenden Komponenten sukzessive in Lösung gebracht und ein Gesamtvolumen von 10µl mit bidestilliertem Wasser eingestellt:

2 M	Thioharnstoff
4% (w/v)	CHAPS
30 mM	DTT
5 mM	Tris-Base
1 Tablette	Complete™ Mini

SDS-PAGE (2. Dimension)

In der zweiten Dimension werden die Proteine gegenüber der Laufrichtung der isoelektrischen Fokussierung um 90° versetzt gemäß ihrer Molekulargewichte aufgetrennt. Für einen effizienten Transfer von der ersten auf die zweite Dimension müssen die Proteine vorher mit SDS beladen werden. Durch die Anlagerung des stark anionischen Detergens wird die Nettoladung der Proteine überdeckt, so dass alle nach Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung der Anode wandern.

Die fokussierten IPG-Streifen wurden für 10 Minuten in Äquilibratorlösung A (50 mM Tris/HCL, pH =8,8; 6M Harnstoff; 30% (w/v) Glycerin; 2% (w/v) SDS; 1% (w/v) DTT) und für weitere 10 Minuten in Äquilibratorlösung B (50 mM Tris/HCL, pH =8,8; 6M Harnstoff; 30% (w/v) Glycerin; 2% (w/v) SDS; 4% (w/v) Iodacetamid) geschwenkt. Durch diese aufeinanderfolgende Behandlung mit DTT und Iodacetamid erfolgte zusätzlich eine Reduzierung und anschließende Carboxyamidomethylierung der Cysteinreste, wodurch der denaturierte Zustand der Proteine gewährleistet wurde. Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde das Iso-Dalt® Elektrophoresesystem (Hoefer/Amersham Bioscience) verwendet, welches ein gleichzeitiges Gießen von über 20 Polyacrylamidgelen und eine gleichzeitige elektrophoretische Auftrennung von bis zu zehn solcher Gele erlaubte.

Mit Hilfe einen Gradientenmischers wurden 12-15% ige Gradientengele (20 x 18 x1,5cm) gegossen, die zur Begradigung der Geloberfläche mit wassergesättigtem 1-Butanol überschichtet wurden.

Zum Starten der 2. Dimension wurden die IPG-Streifen nach der Äquilibration auf das SDS-Gel gelegt und dort mit Bromphenolblau angefärbter 1% (w/v) Agarose (niedrige Elektroendosmose, Biomol) fixiert. Die anschließende Auftrennung erfolgte im Laufpuffer (200mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 24mM Tris/HCl, pH=8,6) bei 10°C über Nacht für 2300-2400 Vh.

Gellösungen für 12-15% Gradientengele (ca.22 Gele)

	<u>„leichte“ Lösung (12%)</u>	<u>„schwere“ Lösung (15%)</u>
bidest. Wasser	372,86 ml	184,37 ml
Rotiphorese Gel 30	428,57 ml	535,71 ml
Puffer D	275 ml	275 ml
87% Glycerin	-	88 ml
10% (w/v) APS	11 ml	5,5 ml
10% (v/v) TEMED	1,57 ml	0,42 ml

2.6.3. 16BAC/SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die 16BAC/SDS-PAGE ist eine zweidimensionale Gelelektrophorese-Technik, bei der die Auftrennung der Proteine in beiden Dimensionen gemäß ihres Molekulargewichtes erfolgt (Macfarlane et al., 1989). In der ersten Dimension werden die Proteine in Anwesenheit des kationischen Detergens Benzyldimethyl-n-Hexa-Decylammoniumchlorid (16-BAC) über ein „inverses“ diskontinuierliches Elektrophoresesystem getrennt. Die zweite Dimension besteht aus einer diskontinuierlichen SDS-PAGE, wobei in der vorliegenden Arbeit eine Tricin-SDS-PAGE (Schägger und von Jagow, 1987) verwendet wurde. Durch die Kombination dieser unterschiedlichen Elektrophoresesysteme wird eine Trennung der Proteine in einzelne Proteinspots erzielt.

Die 16BAC/SDS-PAGE wurde für die Trennung von Membranproteinen verwendet. Hierzu wurde ein aufgereinigtes Membranpellet (s. Kapitel 2.5.3/2.5.4) in 300µl 16BAC-Probenpuffer (1,5x) aufgenommen und für 5 Minuten bei 60°C inkubiert. Vor dem Auftragen in die Geltasche wurde die Probe zur Entfernung ungelöster Bestandteile 20 Minuten bei 100.000xg zentrifugiert.

Für die Durchführung der 16BAC/SDS-PAGE wurde das Protean™ II System von Biorad (16cm x 18cm x 1cm) verwendet. Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 30 Volt, wobei die entsprechenden Gellösungen und Puffer nach Angaben von Hartinger et al. (1996) angesetzt wurden. Zur Visualisierung der aufgetrennten Gelbanden wurde das Gel für die Dauer von 1 Stunde in Fixierlösung (35% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert und 30 Minuten lang in einer Coomassie R-250-Lösung (s. Kapitel.2.7.2.) angefärbt. Anschließend wurde die Protein-Spur mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten, mehrerer Stunden in der Fixierlösung gewaschen und dreimal für je 10 Minuten in einer Pufferlösung (100mM Tris-HCL, pH=6,8) inkubiert. Nach gründlichem Abtropfen wurde der Streifen zwischen den Glasscheiben in Höhe der sonst vorhandenen Geltaschen in den Gelgießstand eingebaut. Das Tricin-Trenngel und das Tricin-Spacergel wurden aufeinanderfolgend bis ca. 2cm unter den Gelstreifen gegossen und zur Begradigung der Oberfläche mit Übersichtungslösung (0,1M Tris-Base, pH=8,45; 0,1%(w/v) SDS) überdeckt. Die Übersichtungslösung wurde entfernt und der Gelstreifen in das Tricin-Sammegel eingegossen. Fünf Minuten vor der Elektrophorese wurde das Gel mit 3x Tricin-probenpuffer überdeckt. Die Elektrophorese fand unter Kühlung (20°C) bei 45mA pro Gel und einer Spannungsbegrenzung von 500V über Nacht statt.

Gellösungen für zwei Tricin- SDS- Gele

	<u>Sammegel(4%)</u>	<u>Trenngel(16,5%)</u>	<u>Spacergel(10%)</u>
bidest. Wasser	16,8 ml	-	9,9 ml
Acrylamidlösung	3,2 ml	48 ml	10,1 ml
Gelpuffer	6,2 ml	30 ml	10 ml
Glycerin	-	12 ml	-
10% APS	200 µl	290 µl	100 µl
TEMED	20 µl	29 µl	10 µl

Tricin- Anodenpuffer

0,2 M Tris/HCL, pH=8,9

Tricin-Gelpuffer

3 M Tris/HCL, pH=8,45
0,3% (w/v) SDS

Tricin- Kathodenpuffer

0,1 M Tris-Base

0,1 M Tricin

0,1 % (w/v) SDS

Acrylamidlösung

48% (w/v) Acrylamid

1,5% (w/v) Bisacrylamid

Tricine-Probenpuffer (3x)

15% (w/v)	SDS
30% (v/v)	Glycerin
150 mM	Tris- Base
6% (v/v)	β -Mercaptoethanol
0,006% (w/v)	Bromphenolblau

2.6.4. Blue-Native/SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophores

Die von Schägger und von Jagow (1991) entwickelte Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) ist eine Methode, um Protein-Protein-Interaktionen nachweisen zu können. In der ersten Dimension erfolgt die Trennung der Proteine unter nicht denaturierenden Bedingungen, so dass die native Konformation der Proteine und somit auch die Struktur von Proteinkomplexen erhalten bleibt. Die Proteine bzw. Proteinkomplexe werden durch Anlagerung von Coomassie Brilliant-Blau negativ geladen und können daher in Anwesenheit von nichtionischen Detergenzien im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Anschließend folgt eine denaturierende Tricin-Gelelektrophorese, bei der die Proteinkomplexe in ihre einzelnen Bestandteile aufgetrennt werden.

Alle Schritte der 1. Dimension wurden bei 4°C durchgeführt. Für die Probenvorbereitung wurde ein unaufgereinigtes Membranpellet in 300µl ACA 750 resuspendiert und vorsichtig mit 100µl 10% Dodecylmaltosid versetzt. Um ungewollte Protease-Aktivitäten zu verhindern, wurde 21µl Proteinase-Inhibitor-Lösung (1 Tablette CompleteTM Mini, EDTA free/1ml bidest. Wasser) hinzugefügt. Die Probe wurde für 20 Minuten bei 13000xg zentrifugiert und der Überstand vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 10% Volumenanteil 5% Serva-Blue-G-Lösung (750mM Aminocaprinsäure; 5% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250) versetzt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Probe wurde mit Hilfe des ProteanTM II System von Biorad (16 x 18 x 1cm) in einem 4,5-16% igem Gradientengel durchgeführt. Der Einlauf der Proben ins Gel erfolgte bei 100 V für 45 Minuten, der Trennlauf bei 15 mA und einer Limitierung der Spannung auf maximal 500V.

Zur Durchführung der zweiten Dimension wurden eine interessierende Spur ohne ihren Lauffront-Bereich aus dem Gel der 1. Dimension herausgetrennt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in der Denaturierungslösung (1% β -Mercaptoethanol; 1% (w/v) SDS) inkubiert. Um das β -Mercaptoethanol anschließend wieder zu entfernen, wurde der Gelstreifen mehrmals mit 1% (w/v) SDS-Lösung behandelt. Zum Transfer der Proteine von der ersten auf die zweite Dimension wurde der Gelstreifen wie im Kapitel 2.6.3 beschrieben, in das Tricingel eingegossen. Im Gegensatz zu der 16BAC/SDS-PAGE erfolgt die Elektrophorese allerdings ohne Überschichtung des Gels mit Tricin-Probenpuffer.

6x BN-Gelpuffer

1,29 M Aminocaprinsäure
150 mM Bis-Tris, pH=7 bei 4°C

ACA 750

750 mM Aminocaprinsäure
50 mM Bis-Tris, pH=7 bei 4°C
0,5 mM EDTA

BN-Sammelgel (4%)

11,3 ml bidest. Wasser
1,2 ml Acrylamidlösung
2,5 ml 6x BN-Gelpuffer
65 μ l 10% (w/v) APS
6,5 μ l TEMED

Acrylamidlösung

48% (w/v) Acrylamid
1,5% (w/v) Bisacrylamid

Gellösungen für ein 4,5-16% BN- Gradientengel:

	<u>„leichte“ Lösung (4,5%)</u>	<u>„schwere“ Lösung (16%)</u>
Bidest Wasser	15,4 ml	5,5 ml
6 xGelpuffer	3,5 ml	3 ml
Acrylamidlösung	21 ml	6 ml
87% Glycerin	-	4 ml
10%APS	95 μ l	61 μ l
TEMED	9,5 μ l	6,1 μ l

Das Gradientengel wurde mit Hilfe eines Gradientformers (Amersham) gegossen, wobei ca. 3ml bidestelliertes Wasser als Überschichtungslösung dienten. Nach dem Auspolymerisieren und der Entfernung des Wassers wurde das Sammelgel mit einem Probekamm hinzugefügt.

5x BN-Kathodenpuffer

250mM Tricin
 75mM Bis-Tris, pH=7 bei 4°C
 0,1% Coomassie 250G
 0,0066 % (w/v) n-Dodecylmaltosid (30 Minuten vor dem Lauf hinzugefügt)

6x BN-Anodenpuffer

300mM Bis-Tris, pH=7 bei 4°C

2.7. Proteinfärbung

Zur Visualisierung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden verschiedene Färbemethoden verwendet:

2.7.1. Silberfärbung

Die sehr sensitive Silberfärbung ermöglicht eine Anfärbung von Proteinen mit geringen Proteinkonzentrationen. Diese Methode bietet gegenüber einer Coomassie-Färbung zwar den Vorteil einer etwa um den Faktor zehn höheren Sensitivität, weist jedoch auch einige Nachteile hinsichtlich der Quantifizierbarkeit der Proteinspots und der Kompatibilität mit anschließenden massenspektrometrischen Analysen auf.

Die Silberfärbung wurde modifiziert nach Blum et al. (1987) in Polyethylenwannen durchgeführt. Dafür wurden die Gele zunächst für mindestens 2 Stunden in Fixierlösung (10% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Ethanol) geschwenkt und anschließend zum Entfernen der Essigsäure dreimal für 45 Minuten in 30% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einminütiger Vorbehandlung der Gele in Sensitivierungslösung (0,02% (w/v) Natriumthiosulfat), folgte die Färbung der Gele für 20 Minuten in der Silbernitratlösung (0,2% (w/v) Silbernitrat; 0,02% (v/v) einer 36,5%ige Formaldehyd-Lösung). Das ungebundene Silbernitrat wurde durch dreimaliges Waschen in bidestilliertem Wasser für je 1 Minute entfernt und die Gele bis zum Erscheinen der Proteinspots in der Entwicklerlösung (3% (w/v) Natriumcarbonat; 0,05% (v/v) einer 36,5%ige Formaldehyd-Lösung; 0,4% (w/v) Natriumthiosulfat) geschwenkt. Die entwickelten Gele wurden zweimal in bidestilliertem Wasser für je 1 Minute gewaschen und die Reaktion daraufhin durch zehnminütige Inkubation in 0,37% (w/v) EDTA-Lösung gestoppt.

2.7.2. Klassische Coomassie- Färbung

Die klassische Coomassie-Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 wurde aufgrund ihrer geringen Sensitivität ausschließlich zur Anfärbung von PVDF-Membranen und zur Visualisierung der 1. Dimension der 16BAC/SDS-PAGE (s. Kapitel 2.6.3) verwendet.

Gebloottete Membranen (s. Kapitel 2.9.3) wurden für 5 Minuten in der filtrierten Coomassie-Färbelösung (25% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,1% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250) geschwenkt und anschließend zur Entfärbung des Hintergrundes für ca. 10 Minuten in Entfärberlösung (40% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Zum Trocknen wurden die Membranen zwischen zwei Filterpapiere gelegt.

2.7.3. Kolloidale Coomassie-Färbung

Die Färbemethode nach v. Neuhoff et al. (1988) mit kolloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 wurde zur Anfärbung der 16BAC/SDS-PAGE-Gele und zur Anfärbung der BN/Tricin-SDS-PAGE-Gele verwendet. Da in beiden Fällen die Proteine bereits während bzw. nach der ersten Dimension in Kontakt mit einem der Coomassie-Farbstoffe gekommen sind, konnte eine effektive Fluoreszenzfärbung dieser Gele nicht mehr durchgeführt werden. Gegenüber der klassischen Coomassie-Färbung hat die kolloidale Coomassie-Färbung die Vorteile einer höheren Sensitivität, einer verbesserter Quantifizierbarkeit und einer reduzierten Hintergrundfärbung. Zur Durchführung der Färbung wurden die Färbelösungen A und B im Verhältnis 98:2 gemischt und in einer Schottflasche zur Ausbildung der Kolloide für mindestens 4 Stunden kräftig geschüttelt. Schließlich wurde Methanol mit einer Endkonzentration von 20% (v/v) hinzugefügt und die Färbelösung auf die zuvor mit Fixierlösung behandelten Gele (ca. 2 Stunden) gegossen. Die Färbung erfolgte über Nacht, genau wie die anschließende Hintergrundfärbung in destilliertem Wasser.

Färbelösung A

10% (w/v) Ammoniumsulfat
2% (w/v) 85% Phosphorsäure

Fixierlösung

30% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Essigsäure

Färbelösung B

5% (w/v) CBB G-250

2.7.4. Fluoreszenzfärbung mit RuBPS

Zur sensitiven Anfärbung von Proteinspots aus 2D-Gelen wurde die Fluoreszenzfärbung mit dem Ruthenium-Chelat-Komplex (RuBPS) nach Rabilloud et al. (2001) angewandt. Die Empfindlichkeit dieser Nachweismethode liegt zwischen der Silberfärbung und der Färbung mit dem kolloidalem Coomassie Brilliant Blue, hat allerdings den Vorteil einer guten Quantifizierbarkeit der Proteinspots und ist zudem kompatibel mit der Massenspektrometrie.

Die Gele wurden nach der Elektrophorese mindestens 2 Stunde in Fixierlösung (40% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert und danach je viermal für 30 Minuten mit 20% (v/v) Ethanol gewaschen. Die anschließende Färbung erfolgte über Nacht in einer 20% (v/v) Ethanol-Lösung, die mit 10 µl/l der nach Rabilloud et al. hergestellten RuPS-Stammlösung versetzt wurde. Um Hintergrundanfärbungen zu entfernen; wurden die Gele erneut über Nacht in Fixierlösung geschüttelt. Die letzten beiden Schritte wurden im Dunklen durchgeführt, so dass der Licht-sensitive Farbstoff nicht beeinflusst wurde. Die Aufnahme der Gele wurde mit Hilfe eines Videokamerasystems (CDD-Kamera LAS-100 und Intelligent Dark Box, Fujifilm) durchgeführt. Die Aufnahme erfolgte mit der Software Image Reader 2.5 (Fuji Photofilm Co. Ltd.) und die Bearbeitung der Bilder mit dem „AIDA- advanced image data analyser 2.1“ (raytest Isotopenmessgeräte GmbH).

2.8. Autoradiographie

Um die radioaktiv markierten Lipoproteine (s. Kapitel 2.5.5) detektieren zu können, wurden die Proteine nach der Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran geblottet (s. Kapitel 2.9.3) und mit Hilfe des TLC- Scanners Tracemaster 20 von Berthold analysiert.

2.9. Immunologischer Nachweis von Proteinen

2.9.1. Herstellung polyklonaler Antikörper

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurden je zwei Peptidsequenzen des entsprechenden Proteins ausgewählt und von der Arbeitsgruppe MERK an der GBF synthetisiert. Bei der Auswahl der Sequenzen wurde darauf geachtet, dass es sich um möglichst hydrophile Peptide mit einer hohen Proteinspezifität handelt.

Da Peptide selbst zu klein sind, um eine ausreichende Immunantwort zu erzeugen, wurden die Peptide unter Verwendung des „Imject Maleimide Activated Immunogen Conjugation Kit“ (Pierce) an Ovalbumin gekoppelt. Dazu wurden 2-3mg Peptid in Konjugationspuffer (83 mM Na₂HPO₄; 0,1 M EDTA; 0,9 M NaCl; 25 mM NaN₃, pH=7,2) und 2 mg aktiven Ovalbumins in 200µl bidestillierten Wasser gelöst. Die beiden Lösungen wurden vermischt, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und über Gelfiltration aufgereinigt.

Die Immunisierung mit diesen Proben wurde von der Firma Eurogentec in Belgien durchgeführt.

Tabelle 2.1: Peptide für die Immunisierung von Kaninchen

Protein	Peptid 1	Peptid 2
Lmo0255	TKKQLEEQVASQYSAYKESKC	KNVSLKETVKQFEAQGFKKKC
Lmo0355	KTKEKEKTEVTSGASKTSYTC	MNASETKFQKEEGINDSNDKC
Lmo0460	TSNLITEEVAQDKPAEVENLC	EDAEEQKVQNKFSGEYWEEVC
Lm01068	CKSSSNESNKAETKENDTND	CKDSQIGVPDPSRFDSSSTKG
Lmo1757	DRKSDKNPNGLNPASNGNGEC	DYYQKEKYGDTYEQPISDSEC
Lmo1800	EANVKTEQTLKPGSQIKLEGC	RADENKKAIEAVAAKTDNKKC
Lmo2125	NKMTQTLETSQEEIERQEKRC	DGSITVTSEPNKGTSFTIRC
Lmo2417	KDGVKPDQATFDDIKDNPKNC	EKKKDDKNITELVKVLHSKEC
Lmo2594	DETGNKIKITDLNKNDDVVC	QETSPAQIDPKYVQKC
Lmo2595	KAVKKDDSGRFTYTYSLTNDC	RKDLDKNHLTELARDYMESDC

2.9.2. Aufreinigung polyklonaler Seren

Da pro Peptid je zwei Kaninchen parallel immunisiert wurden, standen pro Protein jeweils vier polyklonale Seren zur Verfügung. Um von diesen vier Seren ein geeignetes Serum für die spätere Aufreinigung der polyklonalen Antikörper auswählen zu können, wurde zunächst ein Vortest mit einem Gesamtproteinextrakt von *L. monocytogenes* und einer 1:500 Verdünnung des jeweiligen Serums durchgeführt. Die Seren, bei denen ein spezifischer immunologischer Nachweis des entsprechenden Proteins erfolgte, wurden schließlich für die Aufreinigung der Antikörper mittels CNBr-activated SepharoseTM 4b (Amersham Biosciences) ausgewählt. Zur Aufreinigung der Antikörper wurde je 1g in Wasser aufgequellter Sepharose mit 200ml einer 5mM Salzsäurelösung und 200ml Boratpuffer auf einer Glasfritte (Porengröße 2) gewaschen und in dem Boratpuffer nach Zugabe von 5mg Peptid bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharose mit dem gebundenen Peptid bei 1000xg für 5 Minuten abzentrifugiert, dreimal mit einem Tris-Puffer (1,5 M Tris/HCL, pH=8,8) gewaschen und für eine weitere Stunde in dem Tris-Puffer über Kopf geschüttelt. Es folgte ein PBS-Waschschritt und die Überführung der Sepharose in eine PD-10-Säule. Die Kopplung des Antikörpers an das Peptide wurde durch dreimalige Behandlung der Säule mit dem Serum erreicht. Nachdem die Säule gründlich mit 100ml PBS gespült worden war, erfolgte die Elution des Antikörpers mit 20ml Elutionspuffer A und mit 20ml Elutionspuffer B. Das Eluat wurde in 1ml-Fractionen gesammelt, wobei in jedes Reaktionsgefäß 100µl 1,5 M Tris-Hcl, pH=8,8 zum Neutralisieren vorgelegt wurden. Die Proteinmenge der Fractionen wurde bei einer OD von 280nm bestimmt. Fractionen, bei denen die OD₂₈₀ deutlich über dem Grundwert lag, wurden gepoolt und der enthaltende Antikörper über einen „Vivaspin 20ml Concentrator“ (Vivascience) in PBS aufkonzentriert. Zur Lagerung wurden Aliquots hergestellt, die entweder für längere Zeit bei -20°C oder für einen kürzeren Zeitraum bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

Boratpuffer (pH 8,8)

0, 1M Borsäure
0,5M NaCl

Elutionspuffer A (pH 4,8)

0,1 M Essigsäure
0,5M NaCl

Elutionspuffer B (pH 2,5)

0,2 M Essigsäure
0,5M NaCl

2.9.3. Westernblot

Um in Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine ohne Veränderung des Trennmusters weiteren Analysen zugänglich zu machen, können diese mit Hilfe eines Westernblots auf eine Membran transferiert werden.

Der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roth) wurde im sogenannten „semi-dry“-Verfahren mit Hilfe des Trans-Blot SD Transfersystems der Firma Biorad durchgeführt. Die Membran und 8 Lagen Whatman-Papier wurden auf Gelgröße zugeschnitten und nach Aktivierung der Membran in Methanol für kurze Zeit in dem Blotpuffer äquilibriert. Das Gel wurde ebenfalls im Blotpuffer inkubiert und anschließend mit der Membran und dem Whatman-Papier luftblasenfrei auf die Kathode wie folgt geschichtet: 5 Lagen Whatman- Papier/ Polyacrylamidgel/ PVDF-Membran/ 3 Lagen Whatman-Papier. Der Transfer der Proteine fand in Richtung der Anode für die Dauer von 90 Minuten und einer Stromstärke von 0,9 mA pro cm² statt.

Blotpuffer (pH 8,5)

25mM	Tris-Base
190mM	Glycin
0,1% (w/v)	SDS
20% (v/v)	Methanol

2.9.4. Immunfärbung und Chemolumineszenz

Zum immunologischen Nachweis der geblotteten Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blocklösung (TBS-T+10% (v/v) FCS) abgesättigt und anschließend mit dem in Blocklösung gelösten Primäantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen der Membran für je 10 Minuten in TBS-T, TBS-T+0,1M Natriumchlorid und TBS-T+0,5% (v/v) Triton X-100 entfernt. Danach erfolgte für 1 Stunde die Bindung des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers, der ebenfalls in geeigneter Verdünnung in der Blocklösung gelöst wurde. Nach Wiederholung der Waschschrte wurde die Antikörperbindung an ein spezifisches Protein auf der Membran mit Hilfe des „Lumi-Light Western Blotting Substrat“ (Amersham Bioscience) sichtbar gemacht. Das Prinzip dieses Reagenzes beruht auf der Umsetzung von Peroxid durch die an den Antikörpern

gekoppelte Peroxidase und einer anschließenden Chemolumineszenzreaktion des Luminols, welches zur Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 425nm führt.

Das Lumilight Western Blotting Substrat wurde gemäß Herstellerangaben aus zwei Komponenten gemischt und die gewaschene Membran für ca. 1 Minute in der Lösung inkubiert. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde das Videokamerasystem CDD-Kamera LAS-100 und die Intelligent Dark Box, (Fujifilm) eingesetzt. Die Aufnahme erfolgt mit der Software Image Reader 2.5 (Fuji Photofilm Co. Ltd) und die Bearbeitung der Bilder mit AIDA Image Data Analyser (raytest Isotopenmessgeräte GmbH).

TBS-T

0,1% (v/v) Tween in TBS

Primärantikörper

Polyklonale Antikörper aus Kaninchen gegen die im Kapitel 2.9.1 aufgelisteten Proteine.

Sekundärantikörper

B4c: Ziege anti Kaninchen, Peroxidase gekoppelt, Verdünnung 1:2000 in 10% (v/v) FCS in TBS-T

2.10. Massenspektrometrische Analysen zur Proteinidentifizierung

Zur Identifizierung einzelner Proteine wurde sowohl die Methode des „Peptidmassenfingerabdrucks“ durch MALDI-TOF-MS als auch die Peptidsequenzierung durch MS/MS-Analysen angewandt. Der Grundstein für eine erfolgreiche Identifizierung mittels massenspektrometrischer Methoden wurde durch die Veröffentlichung der vollständigen Genomsequenz von *L. monocytogenes* (Glaser et al., 2001) gelegt. Erst durch den Abgleich experimentell ermittelter Massen mit den theoretisch vorhandenen Massen der Genomdatenbank konnte eine sichere Identifizierung der einzelnen Proteine durchgeführt werden.

2.10.1. MS-Probenvorbereitung

Spaltung der Proteine und Elution der Peptide

Die Proteinspots bzw. Proteinbanden wurden zunächst aus dem Polyacrylamidgel ausgestochen, wobei fluoreszenzgefärbte Gele zur Visualisierung der Spots auf den Dark ReaderTM (Clare Chemical Research) gelegt wurden. Nach Überführung der Gelstücke in 1,5 ml Reaktionsgefäße folgte ein fünfminütiger Waschschriff mit bidestilliertem Wasser und eine anschließende, fünfzehnminütige Inkubation der Gelstücke in 50mM Ammoniumbicarbonat. Die Gelstücke wurden für weitere 15 Minuten in Acetonitril dehydriert und in einem SpeedVac-Konzentrator (Typ BA-VC 300 der Firma Bachofer) im Vakuum getrocknet. Proteinspots, die aus den 16BAC/SDS-Gelen bzw. aus den BN/Tricin-Gelen stammten, wurden vor der Proteinspaltung zur Reduzierung und Carbamidomythylierung der Cysteinreste zusätzlich mit DTT und Iodacetamid behandelt. Dazu wurden die Gelstücke von 20mM DTT und 100mM Ammoniumbicarbonat knapp überschichtet und für 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Gelstücke erneut mit Acetonitril behandelt und zur dauerhaften Modifizierung der Cysteine eine Iodacetamidlösung (55mM Iodacetamid; 100mM Ammoniumbicarbonat) für 30 Minuten unter Lichtentzug hinzugefügt. Nach Abnahme der Iodacetamidlösung und der Dehydrierung der Gelstücke mittels Acetonitril wurden die Proben in der SpeedVac getrocknet.

Zur spezifischen Spaltung der Proteine in definierte Peptide wurde modifiziertes und somit vor Autodigestion geschütztes Trypsin (Promega, Mannheim) verwendet. Hierzu wurden die Gelstücke mit 15-30µl der nach Herstellerangaben vorbereiteten Trypsinlösung überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Ausnahmefall erfolgte die Spaltung der Proteine unter Verwendung anderer Proteasen, wie z.B. GluC oder AspN (Biolabs New England), die ebenfalls nach Herstellerangaben eingesetzt wurden.

Um die Peptide am nächsten Tag aus der Gelmatrix zu eluieren, wurde aufeinanderfolgend sowohl eine basische Extraktion mit 15-30µl 25mM Ammoniumbicarbonat als auch eine saure Extraktion mit 30µl 5% (v/v) Ameisensäure durchgeführt. Die Extraktion erfolgte jeweils für 30 Minuten bei 37°C unter kräftigen Schütteln, wobei nach der Hälfte der Zeit zur Extraktion hydrophober Peptide Acetonitril im Verhältnis 1:1 hinzugefügt wurde. Die Eluate wurden abgenommen, in einem neuen Reagenzgefäß vereinigt und schließlich in der SpeedVac getrocknet.

Guanidierung von Lysinresten

Peptide, deren Masse mit Hilfe des MALDI- TOFs bestimmt werden sollten, wurden durch die Modifikation der C-terminalen Lysine zu Homoarginin der massenspektrometrischen Analyse besser zugänglich gemacht (Brancia et al., 2001; Beardsley et al., 2002).

Zur Guanidierung wurden die eluierten Peptide in 10µl 0,5% (v/v) Trichloressigsäure aufgenommen und mit ca. 11µl 25% Ammoniaklösung vermischt. Da ein basischer pH-Wert für die nachfolgende Reaktion notwendig war, wurde zur Kontrolle eine geringe Menge der Lösung auf Lackmuspapier getestet. Die Modifizierung der Lysinreste fand durch die Zugabe von 3µl 10M o-Methylisoharnstoff während einer zwanzigminütigen Inkubation bei 65°C unter leichtem Schütteln statt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 30µl 10% (v/v) Trichloressigsäure gestoppt und die guanidierten Peptide erneut in der SpeedVac eingetrocknet.

Aufreinigung und Entsalzung der Peptide

Die Aufreinigung und Entsalzung der Peptidproben wurde mit Hilfe der ZipTip_{µC18} und ZipTip_{C18} (Millipore, Eschborn) durchgeführt. Bei den ZipTips handelt es sich um Pipettenspitzen mit eingebrachtem „reverse phase“- Material geringen Volumens, an das die Peptide gebunden, gewaschen und anschließend in sehr kleinen Volumina wieder eluiert werden können.

Mittels 3-5 maligen Aufziehens einer 60% (v/v) Acetonitrillösung und einer 0,1% (v/v) Trichloressigsäure wurde das „reverse phase“- Material der ZipTips zunächst aktiviert und gewaschen. Anschließend wurden die zuvor in 15µl 0,2% (v/v) Trichloressigsäure gelösten Peptide durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren von 10µl der Peptidlösung an das Trägermaterial der Minisäule gebunden. Nach dreifachem Spülen der ZipTips mit 0,1% (v/v) Trichloressigsäure erfolgte schließlich die Elution der Peptide. Hierzu wurde die Elutionslösung (60% (v/v) Acetonitril; 0,1% (v/v) Trichloressigsäure) einmal aufgezogen und zusammen mit den gelösten Peptiden entweder direkt auf ein MALDI- Target oder in ein 0,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. Während für die MALDI-TOF-MS-Analysen 1µl Elutionslösung verwendet wurde, wurden die Peptide für die Q- TOF-MS- Analyse in 4µl Elutionslösung eluiert.

2.10.2. MALDI-TOF MS

Zur Bestimmung der exakten Peptidmassen eines enzymatisch gespalteten Proteins wurde die Methode der MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry) angewandt. Bei dieser Methode werden die Peptide mit einer organischen Matrixsubstanz auf einem metallischen Probenhalter (das sogenannte Target) kokristallisiert und anschließend im Hochvakuum durch einen gepulsten Laserbeschuss niedriger Energie ionisiert. Die ionisierten Peptide werden in einem elektrischen Feld gerichtet beschleunigt und auf einer feldfreien Diftstrecke nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis aufgetrennt. Durch die Messung der spezifischen Flugzeiten kann im kalibrierten System das exakte Masse/Ladungs-Verhältnis der einzelnen Moleküle bestimmt werden. Im Gegensatz zu anderen massenspektrometrischen Methoden sind bei der MALDI-TOF-MS allerdings fast ausschließlich einfachgeladene Peptide messbar (Karas et al., 2000).

Die erhaltenen Massenwerte stellen in ihrer Gesamtheit einen Protein spezifischen „Massenfingerabdruck“ dar, der mit den in der Datenbank vorhandenen theoretischen Massenfingerabdrücken aller offenen Leserahmen des listeriellen Genoms verglichen wird und so zur Identifizierung des Proteins führen kann.

Als Matrixsubstanz wurde α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure verwendet, die zur Kokristallisation im Volumen von 1 μ l kurz nach der aufgereinigten Peptidprobe auf das Target pipettiert wurde. Die Messung erfolgte mit dem Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltronik, Bremen), wobei zur Kalibrierung der Messwerte der „Peptide Calibrations Standard“ der gleichen Firma eingesetzt wurde.

Proben, bei denen die Methode des Peptidmassenfingerabdruckes zu keiner sicheren Identifizierung führte, wurden mit Hilfe der „LIFT“- Technik des Ultraflex TOF/TOF analysiert. Hierbei wurden MS/MS-Spektren von einzelnen Peptiden regeneriert, wodurch die Proteinidentifizierung durch Peptidsequenzierung ermöglicht wurde (Suckau et al., 2003).

Zur Auswertung der Spektren wurde die Software Knexus (Proteometrics) und im späteren Verlauf der Arbeit die Software Biotoools (Bruker Daltronics, Bremen) benutzt. Beide Programme ermöglichen sowohl eine automatisierte Peakdetektion als auch eine automatisierte Datenbanksuche in einer intern eingerichteten NCBI- Datenbank oder in einer *L. monocytogenes*-Datenbank. Während bei Knexus die Datenbanksuche mit Hilfe von Profound (Proteometrics) erfolgt, wird bei dem Biotoool-Softwarepaket das Suchsystem von Mascot (Matrix Science) verwendet.

2.10.3. LC-MS

Bei der LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) erfolgt die Auftrennung und Massenanalyse einer enzymatisch gespalteten Proteinprobe über die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie.

Für die Untersuchung wurden zum einen Membranproteine über eine eindimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proben wie in dem Kapitel 2.10.1. beschrieben aus dem Gel eluiert. Zum anderen wurden aufgereinigte Membrane direkt in 200µl Trypsinpuffer resuspendiert und die Membranproteine bei 37°C über Nacht enzymatisch gespalten. Nach zwanzigminütiger Ultrazentrifugation der Peptidlösung bei 104.300xg und 20°C wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Reagenzgefäß überführt und in die SpeedVac gestellt.

Die eingetrockneten Proben wurden in 0,1%(v/v) Trifloressigsäure gelöst und ohne Aufreinigung über die ZipTips im Volumen von 10µl (50-500ng Protein) in die Ultimate Nano-HPLC (LC Packings/Dionex) injiziert. Die Auftrennung der Peptide erfolgte über eine C₁₈-Säule (75µm, 150mm, PepMap), wobei ein 120 Minuten-5%-60%B-Gradient (A= 0,1% (v/v) Ameisensäure; 0,1% (v/v) Ameisensäure, 80% (v/v) Acetonitril) und eine Flussrate von 200nL/min verwendet wurde. Die aufgetrennten Peptide wurden schließlich in dem an die Nano-HPLC gekoppelten Q-TOF (s. Kapitel 2.10.4) analysiert.

2.10.4. Q-TOF- MS

Bei der Quadrupol „Time Of Flight“ (Q-TOF) Analyse werden die enzymatisch gespalteten Peptide durch einen Elektrospray-Prozess ionisiert und im elektromagnetischen Feld beschleunigt. In der Quadrupol-Einheit lässt sich dann ein doppelt oder dreifach geladenes Peptid auswählen und gezielt in die sogenannte Kollisionszelle überführen. Dort kommt es durch Kollision des Peptidmoleküls mit Argonatomen zur unspezifischen Fragmentierung des Peptides. Die resultierenden Fragmente werden in der anschließenden TOF-Einheit des Gerätes aufgetrennt und die Masse/Ladungsverhältnisse anhand der Flugzeiten bestimmt.

Da die Peptide in der Kollisionszelle bevorzugt zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff der Peptidkette zerfallen, kann man den Massenunterschieden der Peptidfragmente Aminosäuren zuordnen und auf diese Weise die Sequenz des Peptides bestimmen.

Die Messung wurde mit dem Q-TOF II von Micromass durchgeführt. Mit Hilfe von MassLynx 4.0 (Micromass) wurden automatisch Peaklisten erstellt, die durch den Datenbankvergleich mit Hilfe von Mascot zur Identifizierung der Proteine führte.

2.11. N-terminale Proteinsequenzierung

Die N-terminale Proteinsequenzierung durch Edman –Abbau (1950) wurde zur Analyse des N- Terminus einzelner Proteine eingesetzt.

Auf PVDF-Membranen geblottete Proteine wurden in der Abteilung Strukturanalyse der GBF Braunschweig mit Hilfe des „494 Protein Sequencer“ von Applied Biosystem GmbH sequenziert.

2.12. Infektion von Gewebekulturzellen mit *Listeria monocytogenes*

Jeweils eine Kolonie des EGD-Wildtyps als auch der *lgt*- Deletionsmutante wurden von einer BHI-Agarplatte mit einer Impföse abgenommen, in 5ml BHI-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelkolben angezogen. Von den Bakteriensuspensionen wurde jeweils 1ml für 3 Minuten bei 3000xg pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Bakterien wurden anschließend im Infektionsmedium (Zellkulturmedium ohne FCS) resuspendiert und mit Hilfe einer Thomakammer (0,02mm x 0,0025mm²) die Anzahl der Bakterien pro Milliliter bestimmt.

Einen Tag vor der Infektion wurden 6×10^4 eukaryontischen Zellen pro Milliliter in 6-well-Kulturschalen (2ml/well) ausgesät und weiter im Brutschrank inkubiert. Für die Immunfluoreszenzaufnahmen erfolgte die Kultivierung der Zellen auf 12mm Deckgläschen, die jeweils zu dritt in eine Kammer der 6-well-Kulturschale positioniert wurden. Die Deckgläschen wurden vorher mit einer Lösung aus 60% (v/v) Ethanol und 40% (v/v) HCL für die Dauer von 30 Minuten gereinigt, mehrmals mit bidestilliertem Wasser gewaschen und schließlich getrocknet. Zur Sterilisation wurden die Kulturschalen mit den Deckgläschen für 45 Minuten unter eine UV-Quelle gestellt.

Um infektionshemmendes FCS zu entfernen, wurden die adhärenen Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 2ml Infektionsmedium überschichtet. Zur Infektion wurden die Bakterien

im Verhältnis 6:1 bzw. bei den Immunfluoreszenzaufnahmen im Verhältnis 150:1 zu den Zellen gegeben und die Kulturschale bei 1000 xg und 37°C für 4 Minuten zentrifugiert. Nach 30 Minuten Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem das Infektionsmedium gegen Gentamycin- haltiges (50µg/ml) Kulturmedium ersetzt wurde. Ein zweimaliger Waschschrift mit PBS dazwischen sollte die Entfernung extrazellulärer Listerien unterstützen. Die infizierten Zellen wurden weiterhin im Brutschrank inkubiert.

2.11.1. Ausplattierung intrazellulärer Bakterien

Um die Invasivität und das intrazelluläre Wachstum der beiden Listerienstämme in eukaryontischen Zellen zu vergleichen, wurden die infizierten Zellen nach 1, 3, 5 oder 7 Stunden Inkubation im Brutschrank aufgeschlossen und die intrazellulären Bakterien in geeigneten Verdünnungen auf BHI- Agarplatten ausgestrichen.

Hierzu wurden die Zellen zunächst sechsmal mit PBS gewaschen und zum Aufschluss der Zellen für 1 Minute mit 500µl eiskaltem 0,2% (v/v) Triton X-100 behandelt. Um den Zellaufschluss zu unterstützen, wurden die Zellen mit einem „Cell Scraper“ (Nunc™) von der Kulturschale geschabt, wobei die Suspension gleichzeitig gut vermischt wurde. Die intrazellulären Bakterien wurden in geeigneten Verdünnungen mit Hilfe des Spiroplaters (Autoplate® 4000, Spiral Biotech) auf BHI-Agar ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und schließlich anhand der gewachsenen Kolonien die Anzahl der intrazellulären Bakterien bestimmt.

2.11.2. Immunfluoreszenzaufnahmen fixierter Zellen.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz fixierter Zellen erfolgt die Visualisierung der Proteine durch die Bindung eines Primärantikörpers, der anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoffs- markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wird.

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden die infizierten Zellen nach 1,2 oder 3 Stunden Inkubation im Brutschrank zweimal mit PBS gewaschen und durch eine zwanzigminütige Behandlung mit 1,5ml 4% (v/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Damit die Antikörper später in die Zellen und zu den entsprechenden Zellkomponenten gelangen konnten, wurden die fixierten Zellen nach zweimaligen Waschen in PBS für 1 Minute mit 0,2% (v/v) Triton X-100

permeabilisiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Für die Antikörper-hybridisierung wurden die jeweiligen Lösungen auf einen Streifen Parafilm, der zuvor auf gewässerten Papiertüchern platziert wurde, getropft und die Deckgläschen mit der zelltragenden Seite nach unten auf die Tropfen gelegt. Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Deckgläschen für 15 Minuten auf 15µl 1% (v/v) FCS in TBS inkubiert. Fünfundvierzig Minuten lang dauerte die anschließende Inkubation der Zellen auf 15µl der Primärantikörper-Lösung, und nach Waschen der Deckgläschen in TBS folgte eine halbe Stunde lang die Hybridisierung mit dem Sekundärantikörper und Phalloidin. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen in TBS entfernt und die Deckgläschen mit der zelltragenden Seite nach unten mit einem Tropfen Mowiol 4-88 (Calbiochem) auf einen Objektträger fixiert und für 1 Stunde getrocknet.

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen der fixierter Zellen wurde das Epifluoreszenzmikroskop Axiovert135 TV (Carl Zeiss) mit regelbarer 100 W Quecksilberhochdruckdampfampe (AttoArc System, Carl Zeiss) und manuell oder Software kontrollierbarem Filterrad verwendet. Durch Optovar-Linsen wurde die Gesamtvergrößerung um das 1,6fache bzw. 2,5fache erhöht. Als Objektive dienten Plan-Neofluar-Immersionsölobjektive (100 x 1,3 NA; 40 x 1,4 NA, Carl Zeiss), wobei das dazu verwendete Immersionsöl der selben Firma einen Brechungsfaktor von 1,518 besaß. Die Regelung der Beleuchtung erfolgte durch elektrisch aktivierbare Schnellverschlüsse (UniBlitz Modul D 122 Shutter-Driver, Visitron- Systems) mit manuell oder Software gesteuertem Shutter. Zur Bildaufnahme wurde ein auf -25°C gekühltes CCD-Kamera-System (TE/CCD-1000 TKB, Princeton Instruments Inc.) mit elektronisch aktivierter Kontrolleinheit und Verschluss eingesetzt. Die Aufnahmekontrolle, Kontrolle der Schnellverschlüsse, die Kamerasteuerung und Bildverarbeitung wurden mit dem IPLab Spectrum Scientific Imaging Software durchgeführt. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop 5.0 und Adobe Page Maker.

Primärantikörperlösung:

K52: Maus anti allg. Listerienproteine IgG, Verdünnung 1:1000 in 1% FCS in TBS

Sekundärantikörperlösung:

B13C: Ziege anti Kaninchen IgG an Alexa FluorTM 594 (Molekular Probes)

Verdünnung 1: 500 in 1% FCS in TBS

Aph12: Phalloidin gekoppelt an Alexa FluorTM 488 (Molekular Probes),

Verdünnung 1: 200, Zusatz zu Sekundärantikörperlösung

2.13. Molekularbiologische Methoden

2.13.1. Plasmide

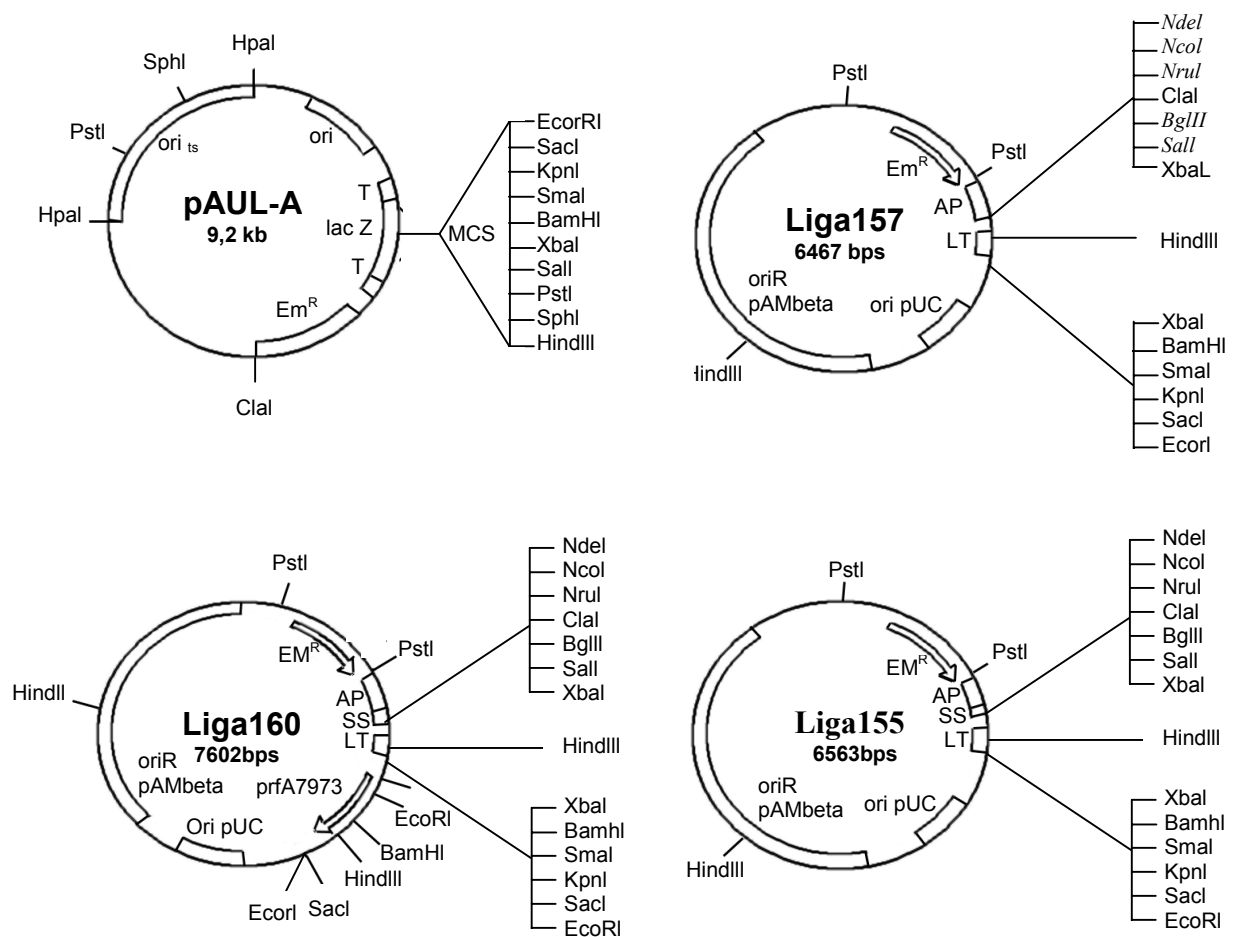
pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen)

pAUL-A (M. Hartl)

Liga157 (B. Gerstel)

Liga160 (B. Gerstel)

Liga155 (B. Gerstel)



AP = ActA Promotor
 SS = Signalsequenz ActA
 LT = Listeriolysin Terminator

Abbildung 2.2. Plasmidkarten von pAUL-A, Liga157, Liga160 und Liga155.

2.13.2. Oligonukleotide

Lgt1-F:	CGT	TGA	TTG	GTT	CTT	CTC	CGG	CG				
Lgt2-R (XbaI):	GAA	CAC	CAT	TAT	CTA	GAA	TTC	CCC	TAC			
Lgt3-F (XbaI):	GGT	AAA	GTA	GTT	CTA	GAG	AAA	TAA	AAA	AGT	TGG	
Lgt4-R:	ATC	TTC	TTC	ATA	TAA	AGC	ACG	AAT	CGC			
Lgt 5-F (NdeI):	GAG	CAT	ATG	ATG	GGT	AAT	GGT	GTT	CAG	C		
Lgt 6-R (SalI):	GCG	CGT	CGA	CCT	TCC	TTT	CTT	AAT	CAA	ACT	CG	
Universal:	GTA	AAA	CGA	CGG	CCA	T						
Reverse:	CAG	GAA	ACA	GCT	ATG	AC						
3Primpl1	GAT	TAA	CAA	ATG	TTA	GAG						
5Primpl2	CAC	TTC	TTA	CAT	CTT	TGT	CCG					

2.13.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur in-vitro Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Benötigt werden hierzu zwei zur DNA homologe, gegenläufige Oligonukleotide, die nach Denaturierung der DNA (95°C) an die Einzelstrang-DNA hybridisieren (35-60°C). Während der anschliessenden Elongation bei 72°C bindet die DNA-Polymerase an die Oligonukleotide und synthetisiert in Anwesenheit von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) neue DNA-Stänge, die komplementär zur Matrize sind. Da die Elongationsprodukte des einen Zyklus als Matrize für den nächsten Zyklus dienen können, führt eine mehrfache Wiederholung des Temperaturzyklus zu einer exponentiellen Vermehrung des DNA-Fragments.

Reaktionsansatz

0,5-1 µg DNA oder Bakterienkolonie (Einzelkolonie wurde direkt von Agarplatte gepickt)

5µl 10 x PCR-Puffer (MgSO₄)

2 x 2,5µl 20µM Oligopeptid F / 20µM Oligopeptid R

2,5µl dNTP mix (TaKaRa)

0,3µl Pwo DNA-Polymerase (Boehringer) 5U/µl

ad 50µl bidest. steriles Wasser

Reaktionsbedingungen im T3 Thermocycler (Biometra)

1. 5 min 95°C
2. 45 sek 95°C
3. 45 sek Oligonukleotid -spezifische Temperatur
4. 45-90 sek 72°C
5. 7 min 72°C

Die Schritte 2-4 wurden insgesamt 29 wiederholt.

Hybridisierungs-Temperatur der verschiedenen Oligonukleotidpaare

Lgt1-F / Lgt2-R (XbaI): 55°C

Lgt3-F (XbaI) / Lgt4-R: 55°C

Lgt1-F / Lgt4-R: 55°C

Lgt 5-F (NdeI) / Lgt 6-R (SalI): 62°C

3Primpl1/ Lgt 6-R (SalI): 62°C

3Primpl1/5Primpl2: 45°C

2.13.4. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Größenbestimmung und zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Bei diesem Verfahren werden die polyanionischen DNA-Fragmente abhängig von ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Kleine Fragmente können die Agarose-Matrix schneller in Richtung der positiven Elektrode durchqueren als große Fragmente. Durch einen parallel aufgetragenen Marker können die Größen der einzelnen Fragmente bestimmt werden. Die Anfärbung der DNA-Fragmente erfolgt mit Ethidiumbromid, einem fluoreszierenden Farbstoff, der in die DNA interkaliert.

1% (w/v) Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid (0,1µg/ml). Als Gelapparatur diente das Gelsystem Mini-Sub®Cell Gt von Biorad. Die Probe wurde mit 5x Stop-Puffer versetzt und ca.1 Stunde bei einer Spannung von 60 Volt elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung der Gele wurde unter UV-Licht mit Hilfe des E.A.S.Y.-System (Herolab) durchgeführt.

10 x TAE-Puffer(pH 7,5)

2 M	Tris-Base
1 M	Natriumacetat
50 mM	EDTA

Laufpuffer

1 x TAE-Puffer

5 x Stop-Puffer

15% (v/v)	Ficoll
50 mM	EDTA
0,4% (w/v)	SDS
10 x TAE-Puffer	
0,05% (w/v)	Xylenblau
0,05% (w/v)	Bromphenolblau

2.13.5. DNA-Elution aus Agarosegelen

DNA-Fragmente spezifischer Größe wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick® gel extraction Kits“ (Qiagen) aus der Agarose isoliert und aufgereinigt. Das Verfahren beruht auf dem Schmelzen der Agarose, der Bindung der DNA an eine Silica-Matrix während der folgenden Waschschrte und schließlich der Elution der DNA von der Matrix. Die Durchführung der Methode erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

2.13.6. Restriktion von DNA

Durch die Spaltung der DNA mittels Restriktionsenzyme kann ein DNA-Fragment aus einem DNA-Molekül restringiert und in einen geeigneten Vektor kloniert werden. Restriktionsenzyme erkennen kurze, spezifische Nukleotid-Sequenzen und spalten die doppelsträngige DNA in diesem Bereich. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Restriktionsenzyme von MBI Fermentas verwendet: EcoR1, EcoRV, XbaI, NdeI, Sall, HindIII. Die optimalen Restriktionsbedingungen (Temperatur, Verdaulänge und Verdaupuffer) sind für jedes Enzym spezifisch und wurden nach Angaben des Herstellers befolgt.

Standard-Restriktionsansatz

5µl	10x Puffer
0,5-5µg	Plasmid-DNA oder PCR-Fragment
1µl	Restriktionsenzym (10-20 U /µl)
ad 50µl	bidest. steriles Wasser

2.13.7. Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase verhindert eine unbeabsichtigte Verbindung von DNA-Fragmenten, wie z.B. der Rezirkularisierung des geschnittenen Vektors. Das Enzym entfernt am 5'-Ende der DNA-Moleküle die Phosphatgruppen, so dass 5'-Hydroxylgruppen zurückbleiben.

CIP (calf intestinal alkaline phosphatase)-Ansatz

50µl	Restriktionsansatz
50µl	bidest. steriles Wasser
11µl	10 x CIP-Puffer (MBI Fermentas)
1µl	CIP (MBI Fermentas) 10U/µl

Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde erneut 1µl der alkalischen Phosphatase zu dem Ansatz gegeben und weitere 30 min bei 37°C inkubiert.

2.13.8. Ligation von DNA

Das Enzym T4-DNA-Ligase ermöglicht die Verbindung von DNA-Molekülen, wie z.B. die Zusammenfügung eines PCR-Amplifikat mit einem linearisierten Vektor.

Unter ATP-Verbrauch schließt die T4-DNA-Ligase die Phosphatdiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Endes und der 3'-Hydroxylgruppe des anderen DNA-Endes.

Für die Ligrationsreaktion wurden gleichgroße Restriktionsfragmente im Verhältnis 1:1 und ein linearisierte Vektor mit dem entsprechenden PCR-Amplifikat im Verhältnis 1:3 gemischt. Die Ligation wurde bei 10°C über Nacht durchgeführt.

Ligationsansatz

0,5-3µg	DNA
1µl	10 x T4-Ligase-Puffer (Roche)
0,4µl	T4-Ligase (Roche) 1U/µl

2.13.9. TOPO®- Klonierung

Die Klonierung von PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kits (Invitrogen), der speziell für die Vermehrung von PCR-Produkten mit „glatten“ Enden entwickelt wurde.

4µl PCR-Produkt wurden vorsichtig mit 1µl der TOPO® salt solution und 1µl des pCR®-Bunt II-TOPO®-Vektors vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2µl des Reaktionsansatzes zu einem Aliquot der One Shot® Chemically Competent *E. coli* gegeben und durch Drehen des Reaktionsgefäßes miteinander vermengt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Bakterienzellen für 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Es folgte eine weitere Inkubation (2 Minuten) auf Eis und die Zugabe von 250µl sterilem SOC-Medium. Die chemisch transformierten Zellen wurden zur Regeneration eine Stunde lang bei 37°C leicht geschüttelt und schließlich auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit 50µg/ml Kanamycin ausplattiert. Zur Selektion der positiven Klone wurden die Agarplatten bei 37°C über Nacht im Brutschrank gelagert.

SOC-Medium

2% (w/v)	Bacto Trypton
0,5% (w/v)	Bacto Hefe- Extrakt
10mM	NaCl
2,5mM	KCl
10mM	MgCl ₂
10mM	MgSO ₄
20mM	Glucose

2.13.10. Transformation von *E. coli*

Unter dem Begriff Transformation versteht man die Übertragung von DNA in Bakterienzellen. Da die meisten Bakterien unter normalen Bedingungen DNA nur in geringen Mengen aufnehmen, müssen die Bakterien zuvor chemischen oder physikalischen Behandlungen unterzogen werden. Bakterienzellen, die aufgrund einer solchen Behandlung eine erhöhte Aufnahmefähigkeit für DNA-Moleküle besitzen, bezeichnet man als „kompetente Zellen“.

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*- Zellen wurde eine über Nacht-Kultur von *E. coli* TG2 1:50 mit SOB-Medium verdünnt und bei 30°C im Schüttelinkubator (180rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die Bakterien wurden durch zehnminütige Zentrifugation bei 5000xg pelletiert und in eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Zwanzig Minuten wurden die Zellen auf Eis inkubiert, bis sie erneut abzentrifugiert und in 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen wurden. Nach ca. 8 Stunden Inkubation auf Eis wurde 10% Glycerin hinzugefügt und die kompetenten Zellen in je 100µl Aliquots zur Lagerung bei -70°C eingefroren.

Für die chemischen Transformation der kompetenten *E. coli*- Zellen wurde je ein Aliquot mit 7µl Ligationsansatz vorsichtig vermengt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und erneut für zwei Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250µl SOC-Medium erfolgte eine vierstündige Regenerationsphase bei 37°C im Schüttelinkubator. Die Transformanten wurden auf LB-Agarplatten mit 300µg/ml Erythromycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.13.11. Plasmidpräparation

Die Plasmid- Isolierung aus *E. coli*-Transformanten wurde mit Hilfe des GFX Micro Plasmid Prep Kits (Amersham Biosciences) durchgeführt. Das Verfahren wurde für die „Mini-Präparation“ von Plasmid-DNA aus 1-3ml Bakteriensuspension entwickelt. Die Bakterienzellen werden bei diesem Verfahren zunächst mittels alkalischer Zelllyse aufgebrochen. Chromosomale DNA und Proteine werden gefällt und anschließend mit weiteren Zellbestandteilen abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA wird an eine Glasfiber-Matrix gebunden, während der folgenden Waschschrte auf der GFX- Säule zurückgehalten und schließlich mit sterilem bidestilliertem Wasser eluiert.

Die Durchführung der Methode erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers. Zur Ermittlung der Plasmid-Konzentration wurden 2µl des Eluats mit 600µl bidest. Wasser verdünnt und in eine Küvette überführt. Nach Messung der OD₂₆₀ mit der GeneQuant II-Apparatur (Pharmacia Biotech) wurde die DNA-Konzentration des Eluats mit Hilfe der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{DNA } \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{OD}_{260} \times 50 \times 300) / 1000$$

2.13.12. Transformation von *L. monocytogenes*

Die Transformation der Listerien wurde mit Hilfe einer Elektroporation durchgeführt. Hierzu mussten zunächst elektrokompetente Bakterienzellen mit einer porösen Zellwand regeneriert werden. Zur Herstellung dieser Zellen wurden 10ml einer Über-Nacht-Kultur mit 400ml BHI und 100ml 2,5M Sucrose vermengt und für 3 Stunden bei 37°C in den Schüttelinkubator (180rpm) gestellt. Nach Zugabe von Penicillin (12µg/ml) wurden die Bakterien weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert und durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 3500xg pelletiert. Das Pellet wurde mit Hilfe von drei aufeinanderfolgenden Waschschritten gereinigt und schließlich in 1ml der Waschlösung resuspendiert. Um die kompetenten Zellen bei –80°C sicher lagern zu können, wurde 15% Glycerin hinzugefügt und Portionen von je 40µl aliquotiert,

1µg Plasmid-DNA wurde mit den elektrokompetenten Zellen eines Aliquots vermischt, für 2 Minuten auf Eis inkubiert und in eine vorgekühlten Elektroporationsküvette mit 0,2cm Spaltbreite (Bio-Rad) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe des GenPulser-Apparates (Bio-Rad) bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 100 Ohm und einer Kapazität des Kondensators von 25 µF.

Zur Regeneration und zur Ausprägung der Resistenz wurden die transformierten Zellen in 768µl BHI und 192µl 2,5 M Sucrose aufgenommen und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Ausplattierung der Listerien erfolgt auf BHI-Agarplatten mit Erythromycin (5µg/ml), die anschließend über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert wurden.

Waschschritt 1: 250mL 0,5M Sucrose, 1mM Hepes

Waschschritt 2: 100mL 0,5M Sucrose, 1mM Hepes

Waschschritt 3: 30mL 0,5M Sucrose, 1mM Hepes

2.13.13. DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der klonierten DNA wurde eine Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Die Sequenzier-Reaktion erfolgte mit dem BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems .

Reaktionsbedingungen im T3 Thermocycler(Biometra)

1. 15sek 95°C
2. 15 sek 50°C
3. 4 min 62°C
4. 5 min 62°C

Sequenzieransatz

- | | |
|---------|-------------------------|
| 2µl | Big Dye Pemix |
| 0,5-1µg | DNA |
| 3,2 µM | Primer |
| ad 10µl | bidest. steriles Wasser |

Die Schritte 1-3 wurden insgesamt 25 mal wiederholt.

Die Elektrophorese und die Analyse der DNA-Bruchstücke wurden von der Firma GATC übernommen und die Auswertung der erhaltenen Sequenzen wurde mit dem Programmen ABI Sequencing Version 3.2 und DNA star (Lasergen) durchgeführt.

2.13.14. Herstellung einer chromosomalen Deletionsmutante

Für die Konstruktion der Deletionsmutante wurden zunächst die Gen-flankierenden DNA-Bereiche in einer PCR mit den Oligonukleotidpaaren Lgt1-F/Lgt2-R (XbaI) und Lgt3-F (XbaI)/Lgt4-R und dem EGD Wildtypstamm als Matrize amplifiziert. Nach Aufreinigung über die Agarosegelelektrophorese wurden die PCR-Produkte mit der Restriktionsendonuklease XbaI restringiert und in einer Ligationsreaktion miteinander verbunden. Die Ligation wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden Lgt1-F und Lgt4-R und einer anschließenden Agarosegelelektrophorese überprüft. Das 817bp große Ligationsfragment wurde in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor kloniert und in kompetente *E. coli*- Zellen transformiert. Zur Überprüfung der Erythromycin-resistenten Klone erfolgte nach Plasmidpräparation sowohl eine enzymatische Spaltung der DNA mit EcoR1 als auch eine Restriktionsspaltung mit XbaI zur Bestimmung der Insert-Orientierung. Das inserierte Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und EcoRV aus den TOPO-Vektor restringiert und nach entsprechender Aufreinigung in den mit HindIII und SmaI linearisierten, dephosphorylierten pAULA-Vektor kloniert. Zur Vermehrung des pAULA-Vektors wurde zunächst eine Transformation des Plasmids in *E. coli* durchgeführt. Die aus der Transformation resultierenden Klone wurden nach Plasmidpräparation sowohl in der PCR mit den Oligonukleotiden Lgt1-F und Lgt4-R als auch durch eine enzymatischen Spaltung mit EcoR1 und HindIII auf das entsprechende Insert überprüft. Anschließend wurde das

rekombinante Plasmid in den EGD Wildtypstamm von *L. monocytogenes* transformiert, worauf wiederum eine Überprüfung der Klone mittels PCR und Restriktionsspaltung folgte.

Die Integration des temperatursensitiven pAULA-Vektors ins Chromosom von *L. monocytogenes* wurde durch homologe Rekombination bei einer Temperatur von 42°C erreicht. Hierzu wurden die positiven Transformanten 3-4 mal auf BHI+EM₅-Agarplatten ausgestrichen und bei der entsprechenden Temperatur im Brutschrank inkubiert. Die Integration war erfolgreich, wenn in der PCR mit den Universal- und Reverse-Oligonukleotiden kein PCR-Produkt und somit kein freies Plasmid mehr nachgewiesen werden konnte. Zur Kontrolle des PCR-Ansatzes wurden ebenfalls Klone als DNA-Matrize eingesetzt, die vorher keiner Temperaturbehandlung ausgesetzt worden waren.

Zur Exzision des Plasmids aus dem Chromosom wurden die Bakterien in 50ml BHI überführt und bei 28°C im Schüttelinkubator (180rpm) inkubiert. Die Über-Nacht-Kultur wurde 1:1000 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 28°C angezogen. Nachdem die Kultur wiederum 1:20 in BHI verdünnt wurde, wurden die Bakterien für 2 Stunden einem Selektionsdruck von 10µg/ml Erythromycin bei 28°C ausgesetzt. Durch die anschließende Zugabe des bakteriostatischen Antibiotikums Ampizillin (200µg/ml) über Nacht wurden nur die im Wachstum befindlichen Bakterien gehemmt. Die Über-Nacht-Kultur wurde nach einer 1:1000 Verdünnung auf BHI-Agarplatten ausgestrichen, bei 30°C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag auf BHI+EM₅-Platten überstempelt. Nach Selektion der Erythromycin-sensitiven Klone wurden diese ein zweites Mal auf BHI-Platten ausgestrichen und auf BHI+EM₅-Platten überstempelt.

Schließlich wurden die Erythromycin-sensitiven Klone mit den Oligonukleotiden Lgt1-F und Lgt4-R auf die Deletion überprüft. Als Kontrolle diente der EGD Wildtypstamm.

Zur Absicherung der Deletionssequenz wurde die DNA-Sequenz des entsprechenden DNA-Bereichs mit Hilfe der Oligonukleotiden Lgt1-F und Lgt4-R analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung listerieller Membranproteine

3.1.1. Fraktionierung und Aufreinigung von Zellmembranen

Zur Analyse integraler Membranproteine und membranassoziierter Proteine von *L. monocytogenes* wurde zunächst eine Methode zur Isolierung und zur Aufreinigung von Zellmembranen etabliert. Ziel dieser Subfraktionierung war die spezifische Anreicherung der Membranproteine, wobei der Grad an ribosomalen und zytoplasmatischen Verunreinigungen möglichst gering gehalten werden sollte.

Die Isolation der Zellmembranen erfolgte aus Listerien, die bis zum Erreichen der stationären Phase in Minimal-Medium bei 37°C angezogen wurden. Zu Beginn der Arbeit wurde die Membranisolation mittels differentieller Zentrifugation durchgeführt. Diese Methode erwies sich als eine sehr schnelle und einfache Möglichkeit, um Membranen aus einer aufgeschlossenen Zellsuspension zu fraktionieren, hatte allerdings den Nachteil einer starken Kontaminierung durch ribosomale Proteine. Da sich diese zum Teil sehr basischen Proteine trotz verschiedener Waschschrte nicht mehr von der Membranfraktion trennen ließen, wurde eine Methode entwickelt, bei der die Ribosomen stabilisiert und als intakte Einheit von der Membranfraktion getrennt werden konnten. Die Stabilisierung der Ribosomen wurde durch die Zugabe divalenter Kationen im Probenpuffer erreicht. Zur Trennung der Membranfraktion von den stabilisierten Ribosomen wurde auf eine Sucroседichtegradientenzentrifugation zurückgegriffen. Trotz dieser speziellen Trennmethode konnten durch eine gelelektrophoretische Auftrennung und anschließende MS-Analyse weiterhin große Mengen an Proteinen in der Membranfraktion nachgewiesen werden, für die bisher nur zytoplasmatische Funktionen bekannt sind. Diese vermeintlich zytoplasmatischen Rückstände konnten jedoch durch eine Reihe spezifischer Waschschrte entfernt werden. Zunächst wurde ein Waschschrte mit 1M Tris/HCL (pH=7,5) und anschließend ein Waschschrte mit einem Natriumcarbonatpuffer (pH=10,5) durchgeführt. Die Behandlung mit Natriumcarbonat diente der Öffnung von Membranvesikeln, die sich während der Membranisolation bilden und so zum Einschluss zytoplasmatischer Proteine führen können (Hill und Sillena, 1997; Fujiki et al., 1982). Laut Literatur soll die Behandlung mit Natriumcarbonat ebenfalls eine Auswaschung der membranassozierten Proteine zur Folge haben (Santoni et al., 2000). Dieses konnte allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der in der Membranfraktion enthaltenen Proteine zeigte,

dass sogar zwei Waschschr tte mit Natriumcarbonat notwendig sind, um größere Mengen an verbliebenen zytoplasmatischen Proteinen, wie z.B. die Glucose-6-Phosphatisomerase oder die Superoxiddismutase, zu entfernen. Membranassoziierte Proteine, die durch spezifische Interaktionen mit anderen Membranproteinen an die Lipiddoppelschicht gebunden sind, konnten auch nach den drei Waschschr tten in der Membranfraktion nachgewiesen werden (Tab. 8.1, Anhang).

3.1.2. Gelelektrophoretische Auftrennung des Membransubproteoms

Um die Proteinzusammensetzung der aufgereinigten Membransubfraktion zu analysieren, wurde zu Beginn der Arbeit auf den klassischen Ansatz der gelelektrophoretischen Auftrennung und anschließenden massenspektrometrischen Identifizierung der Proteine zurückgegriffen. Hierzu wurde die von Macfarlane et al. (1989) entwickelte 16BAC/SDS-PAGE eingesetzt, die nach Hartinger et al. (1996) ein geeignetes Verfahren zur Auftrennung hydrophober Proteine darstellt. Im Vergleich zu der eindimensionalen SDS-PAGE besitzt die 16BAC/SDS-PAGE ein viel größeres Auflösungsvermögen und kann im Gegensatz zu der 2D-Gelelektrophorese nach O' Farrel ebenfalls zur Auftrennung integraler Membranproteine verwendet werden.

Um zu untersuchen, inwiefern die 16BAC/SDS-PAGE für die gelelektrophoretische Auftrennung der aufgereinigten Subfraktion geeignet ist, wurde zunächst ein Referenzgel erstellt (Abb. 3.1). Übereinstimmend mit den Untersuchungen von Hartinger et al. (1996) konnte durch die massenspektrometrische Analyse von 31 Gelspots gezeigt werden, dass mit Hilfe des angewendeten Systems generell auch Proteine mit putativen Transmembrandomänen aufgetrennt werden können. Für eines dieser Proteine (Lmo1740) werden sogar vier hydrophobe α -Helices vorhergesagt (Tab. 3.1). Bei diesem Protein handelt es sich um die Permease eines Glutamin-ABC-Transportsystems, dessen dazugehöriges ATP-Bindungsprotein (Lmo1739) und Substratbindungsprotein (Lmo1738) ebenfalls in dem Referenzgel detektiert werden konnten.

Fünf von acht Proteinen, für die eine oder mehrere Transmembrandomänen vorhergesagt wurden, besitzen allerdings einen negativen „GRAVY“-Wert. Der „GRAVY“-Wert wurde von Kyte und Doolittle (1982) als Maß für die durchschnittliche Hydrophobizität eines Proteins entwickelt. Ein negativer „GRAVY-Wert“ weist auf einen überwiegend hydrophilen Charakter dieser Proteine hin. Proteine mit einem „GRAVY-Wert“ größer als 0,2 lassen sich

in der Regel nicht mehr über die 2D-Gelelektrophorese nach O' Farrel trennen (Chevallet et al., 1998, Herbert et al., 1998).

Unter den 31 identifizierten Proteinen befinden sich fast ausschließlich Proteine, die entweder eine putative Transmembrandomäne aufweisen oder die aufgrund ihrer Funktion bzw. hohen Homologie zu bereits identifizierten Proteinen anderer Organismen in die Gruppe der membranassoziierten Proteine eingeordnet werden können. Nur bei fünf Proteinen (DnaK, Katabolit-Kontroll Protein A, Transelongationsfaktor EF-TU, Lmo1580, Lmo1888) handelt es sich um mögliche zytoplasmatische Verunreinigungen, wodurch die Effektivität der im Kapitel 3.1. beschriebenen Anreicherungsmethode der Membranproteine bestätigt wird. Während für drei dieser fünf Proteine bisher nur eine zytoplasmatisch lokalisierte Funktion beschrieben worden ist, ist die funktionelle Bedeutung der anderen zwei Proteine noch nicht bekannt (Lmo1580, Lmo1888).

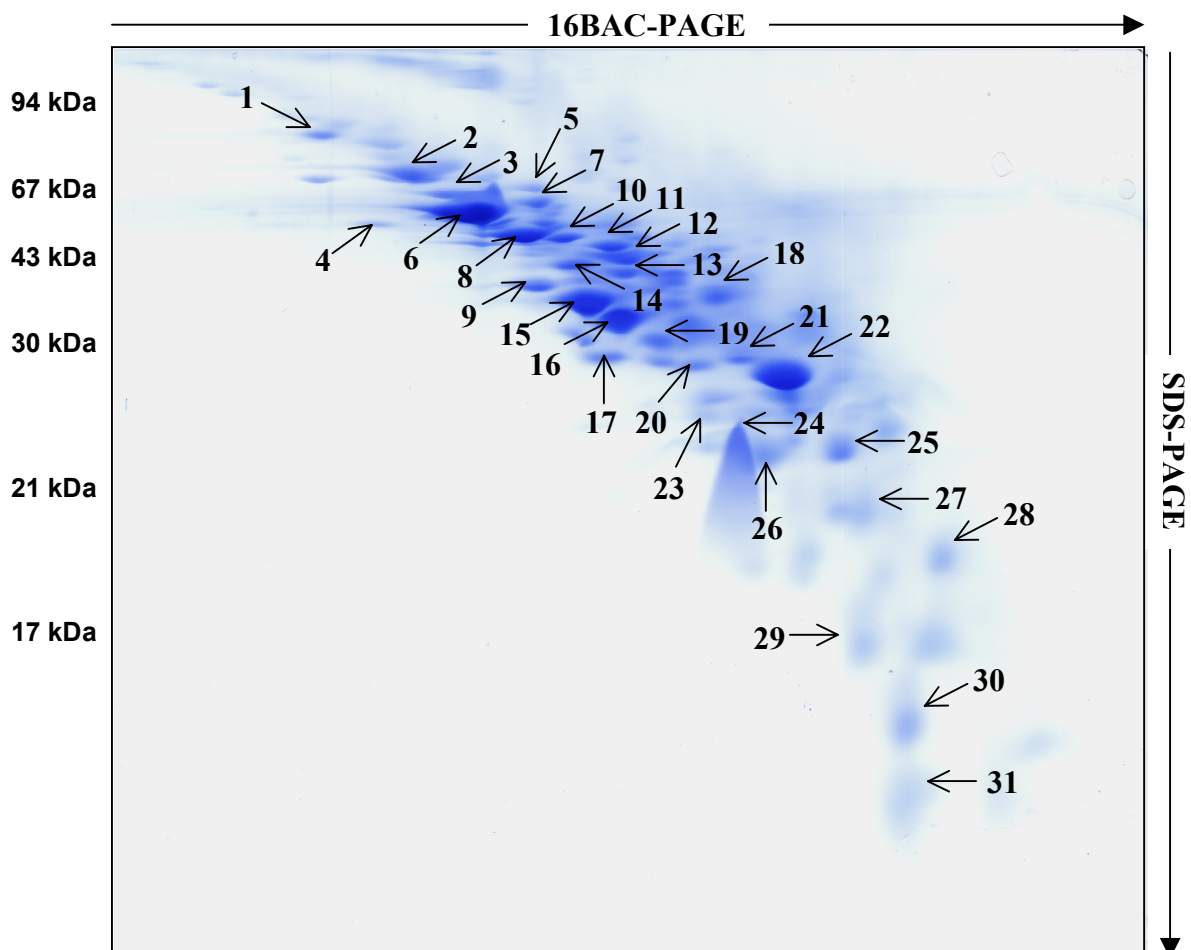


Abbildung 3.1: 16BAC/SDS-Referenzgel. Membranproteine von *L. monocytogenes* wurden aus aufgereinigten Zellmembranen mit Hilfe des kationischen Detergens 16BAC gelöst und über die 16 BAC/SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Aus dem kolloidal Coomassie gefärbtem Gel wurden die markierten Proteinspots ausgestochen und massenspektrometrisch analysiert. Die identifizierten Proteine sind in der Tabelle 3.1 zusammengestellt.

Tabelle 3.1: Identifizierte Proteinspots aus dem 16BAC/SDS-Referenzgel (Abb. 3.1). Die Vorhersage von Signalpeptiden (SP) wurde mit Hilfe von SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) durchgeführt. Der „GRAVY“-Wert wurde mit Hilfe von ProtParam (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/protparam.html>) ermittelt. Die Anzahl der Transmembrandomänen (TM) richtet sich nach den Angaben von Arai et al. (2002).

Spot	Gen	Funktion	SP	GRAVY	TM
1/6	<i>pbpA</i>	Homolog zu Penicillin-Bindungsprotein 2A	ja	-0,644	1
2	<i>ftsH</i>	Homolog zu Zellteilungsprotein FtsH	ja	-0,367	2
3	<i>dnaK</i>	DnaK, Chaperon	nein	-0,430	-
4	lmo0355	Homolog zu Flavocytochrom C-Fumaratreduktasekette A	ja	-0,489	-
5	lmo0052	Homolog zu <i>B. subtilis</i> YybT Protein	ja	-0,138	1
7	lmo1594	Homolog zu <i>B. subtilis</i> EzrA Protein	nein	-0,615	-
8	lmo0135	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	ja	-0,487	-
9	lmo2193/ <i>oppD</i>	Homolog zu ATP-Bindungsprotein OppD (Oligopeptid-ABC-Transporter)	nein	-0,185	-
10	<i>atpA</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (alpha Kette)	nein	-0,114	-
11	<i>atpD</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (beta Kette)	nein	-0,135	-
12	<i>opuCA</i>	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glycinbetain/Carnitin/ Cholin-ABC-Transporter)	nein	-0,311	-
13	<i>gbuA</i>	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glycinbetain-ABC-Transporter)	nein	-0,199	-
14	<i>tufA</i>	Homolog zu Translationselongationsfaktor EF-Tu	nein	-0,272	-
15	<i>tesA</i>	T-Zell stimulierendes Antigen, TesA	ja	-0,461	-
16	lmo2637	Unbekannt, homolog zu konservierten Lipoproteinen	ja	-0,781	-
17a	lmo2219	Homolog zu Posttranslokationschaperon PrsA	ja	-0,789	-
17b	<i>mreC</i>	Homolog zu zellformbestimmendes Protein MreC	ja	-0,311	1
18	lmo0153	Homolog zu Substratbindungsprotein (Zn (II) ABC-Transporter)	ja	-0,534	-
19	lmo0392	Homolog zu <i>B. subtilis</i> YqfA Protein	ja	0,158	1
20a	<i>opuCC</i>	Homolog zu Substratbindungsprotein (Glycinbetain/Carnitin/Cholin-ABC-Transporter)	ja	-0,377	-
20b	<i>ccpA</i>	Katabolit-Kontroll Protein A	nein	-0,208	-
21	lmo1636	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	nein	0,040	-
22	lmo1738	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glutamin-ABC-Transporter)	ja	-0,524	-
23	lmo1849	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Metallkationen-ABC-Transporter)	nein	0,073	-
24	lmo2372	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	nein	-0,126	-
25	lmo0791	Unbekannt	ja	-0,379	1
26	lmo1739	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glutamin-ABC-Transporter)	nein	-0,041	-
27/2 9	lmo1580	Unbekannt	nein	-0,192	-
28	lmo1740	Homolog zu Permeaseprotein (Glutamin-ABC-Transporter)	ja	0,941	4
30	lmo1602	Unbekannt	ja	0,158	1
31	lmo1888	Unbekannt	nein	-0,645	-

Neben Lmo1740 wurden keine weiteren Permeasen in dem Referenzgel nachgewiesen, allerdings befanden sich auffällig viele Substratbindungsproteine und ATP-Bindungskomponenten anderer ABC-Transportsysteme unter den identifizierten Proteinen. Somit wurden 12 Bestandteile von 8 verschiedenen ABC-Transportern durch die MS-Analyse identifiziert. Dieses Ergebnis zeigt, wie dominant die ABC-Transportsysteme in der Zellmembran von *L. monocytogenes* repräsentiert sind.

Insgesamt konnten mit Hilfe der 16BAC/SDS-PAGE bis zu hundert einzelne Proteinspots aufgetrennt werden. Dennoch reicht dieses Auflösungsvermögen nicht annähernd aus, um ein komplexes Proteingemisch, wie die Membransubfraktion, zu analysieren. Wie in dem Referenzgel und in der Tabelle 3.1 zu sehen ist, sind sogar in scheinbar vereinzelter Proteinspots verschiedene Proteine detektierbar (siehe Spot Nr.17 und Spot Nr.20).

3.1.3. Gellose Analyse des Membransubproteoms

Mit Hilfe der gelbasierenden Methode konnten zwar einige integrale Membranproteine nachgewiesen werden, jedoch war der Anteil der hydrophoben Proteine gemessen an dem Anteil der identifizierten membranassoziierten Proteine relativ gering. So konnten bei den meisten ABC-Transportsystemen als auch bei dem ATP-Synthase-Komplex zwar die hydrophilen Bestandteile identifiziert werden, allerdings kein Nachweis der hydrophoben Komplexbestandteile erbracht werden.

Um neben Lmo1740 noch weitere hydrophobe Proteine mit mehreren Transmembrandomänen in der aufgereinigten Membranfraktion identifizieren zu können, wurde alternativ ein gelloser Ansatz zur Analyse des Membransubproteoms von *L. monocytogenes* entwickelt. Das aufgereinigte Membranpellet wurde dabei direkt in Trypsinlösung resuspendiert und über Nacht bei 37°C zur enzymatischen Spaltung der Proteine inkubiert. Das komplexe Peptidgemisch wurde anschließend über eine Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt, und die Proteine wurden über ein Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer mittels Peptidsequenzierung identifiziert. Mit Hilfe dieser automatisierbaren Methode konnten innerhalb eines einzigen Experimentes insgesamt 44 verschiedene Proteine aus der Subfraktion identifiziert werden (Tab. 3.2). Unter den 44 Proteinen befanden sich 16 Übereinstimmungen mit den in Tabelle 3.1 aufgeführten Proteinen und 28 Proteine, die bisher noch nicht in der Membransubfraktion nachgewiesen werden konnten. Für den Großteil dieser zusätzlich identifizierten Proteine wurden eine oder mehrere Transmembrandomänen vorhergesagt. Dazu gehörte sowohl ein hydrophober Bestandteil des ATP-Synthase-Komplexes (AtpF), ein zusätzliches Permeaseprotein (Lmo2115) eines ABC-Transporters als auch eine Reihe weiterer hydrophober Bestandteile bekannter Membranproteinkomplexe, wie z.B. dem Sec-abhängigen Sekretionsapparat und weitere Komponenten der Elektronentransportkette.

Der gellose Ansatz mittels LC-MS/MS stellt somit eine sehr schnelle und geeignete Methode für den qualitativen Nachweis hydrophober Proteine dar. Im Gegensatz zu gelbasierenden Methode kann in diesem Fall jedoch keine Auskunft über den Fragmentierungszustand der

Proteine gegeben werden, da die Proteine generell nur durch die Anwesenheit eines oder einiger weniger Peptide identifiziert wurden (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Proteine, die mittels der LC-MS/MS-Methode aus der aufgereinigten Membranfraktion identifiziert werden konnten. A.: Proteine, die zusätzlich mit Hilfe der LC-MS/MS-Methode identifiziert werden konnten. B.: Übereinstimmungen mit den in Tabelle 3.1 aufgeführten Proteinen. In der Spalte (**P**) ist die Anzahl der sequenzierten Peptide pro Protein angegeben. Die Vorhersage von Signalpeptiden (**SP**) wurde mit Hilfe von SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) durchgeführt. Der „GRAVY“-Wert wurde mit Hilfe von ProtParam (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/protparam.html>) ermittelt und die Anzahl der Transmembrandomänen (**TM**) richtet sich nach den Angaben von Arai et al. (2002).

A.: Proteine, die zusätzlich mit Hilfe der LC-MS/MS-Methode identifiziert werden konnten.

Gen	Funktion	P	SP	GRAVY	TM
lmo0096	Homolog zu PTS-System, mannosenspezifisch, Faktor IIAB	1	nein	-0,123	-
lmo0152	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	2	ja	-0,565	-
lmo0292	Homolog zu Hitzeschockprotein htrA, Serinprotease	1	nein	-0,457	1
lmo0366	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	1	ja	-0,538	-
lmo0641	Homolog zu schwermetalltransportierenden ATPase	1	ja	0,315	6
lmo0962	Epitop LemA	1	nein	-0,125	1
<i>dltD</i>	D-Alaninveresterung von Lipoteichonsäuren	1	ja	-0,624	1
lmo1389	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Zucker-ABC-Transporter)	1	nein	-0,181	-
lmo1527	Homolog zu SecDF	2	ja	0,355	12
lmo1529	Unbekannt	2	ja	0,106	-
lmo1651	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	1	nein	0,153	5
lmo1806	Homolog zu Acyl-Carrier Protein	1	nein	0,009	-
lmo1847	Substratbindungsprotein (Metallionen-ABC-Transporter)	7	ja	-0,412	-
lmo1898	Unbekannt	1	nein	-0,576	1
lmo1941	Unbekannt	1	nein	-0,773	1
lmo2051	Unbekannt, geringe Ähnlichkeit zu Proteasen	1	ja	-0,375	1
lmo2089	Homolog zu Lipasen	2	ja	-0,154	-
lmo2196/ <i>oppA</i>	Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter) OppA	7	ja	-0,694	-
lmo2114	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	2	nein	-0,224	-
lmo2115	Homolog zu ABC-Transporter (Permease)	2	nein	0,438	10
lmo2229	Homolog zu Penicillin-Bindungsprotein	1	ja	-0,375	1
lmo2360	Unbekannt	1	ja	0,047	6
<i>gap</i>	Homolog zu Glycerinaldehyd- 3-phosphat-Dehydrogenase	2	nein	-0,115	-
lmo2463	Unbekannt	3	nein	0,371	12
<i>atpF</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (b-Kette)	1	ja	-0,408	1
<i>ftsE</i>	Homolog zu Zellteilungs-ATP-Bindungsprotein FtsE	1	nein	-0,278	-
lmo2638	Homolog zu NADH Dehydrogenase	1	nein	-0,096	4
lmo2718	Homolog zu Cytochrome <i>d</i> Ubiquinoloxidaseuntereinheit I	1	nein	0,417	9

B.: Übereinstimmungen mit den in Tabelle 3.2 aufgeführten Proteinen.

Gen	Funktion	P	SP	GRAVY	TM
lmo0135	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	6	ja	-0,487	-
<i>ftsH</i>	Homolog zu Zellteilungspotein FtsH	5	ja	-0,367	2
lmo0392	Homolog zu <i>B. subtilis</i> YqfA Protein	6	ja	0,158	1
<i>tcsA</i>	T-Zell stimulierendes Antigen, TcsA	6	ja	-0,461	-
lmo1580	Unbekannt	1	nein	-0,192	-
lmo1594	Homolog zu <i>B. subtilis</i> EzrA Protein	1	nein	-0,615	-
lmo1602	Unbekannt	1	ja	0,158	1
lmo1739	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glutamin-ABC-Transporter)	1	nein	-0,041	-
lmo1740	Homolog zu Permeaseprotein (Glutamin-ABC-Transporter)	2	nein	0,941	4
lmo1849	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Metallkationen-ABC-Transporter)	2	nein	0,073	-
lmo1888	Unbekannt	1	nein	-0,645	-
lmo2219	Homolog zu Posttranslokationschaperon PrsA von <i>B. subtilis</i>	1	ja	-0,789	-
lmo2372	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	1	nein	-0,126	-
<i>atpA</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (alpha Kette)	1	nein	-0,114	-
<i>atpD</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (beta Kette)	5	nein	-0,135	-
<i>tufA</i>	Homolog zu Translationselongationsfaktor EF-Tu	2	nein	-0,272	-

3.1.4. Identifizierung putativ PrfA-regulierter Membranproteine

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte untersucht werden, ob die zwei vorgestellten Methoden ebenfalls für vergleichende Expressionsanalysen geeignet sind. Im Vordergrund stand hierbei die Analyse putativ PrfA-regulierter Membranproteine. Da die bekannten Virulenzfaktoren ActA, Hyl, PlcA, PlcB, Mpl, InlA und InlB alle unter der Kontrolle des positiven Transkriptionsregulators PrfA stehen, bietet die Suche nach PrfA-regulierten Proteinen eine vielversprechende Möglichkeit, um weitere an der Virulenz des intrazellulären Erregers beteiligte Proteine zu identifizieren.

Auf der Suche nach PrfA-kontrollierten Membranproteinen wurde ein Vergleich zwischen dem Membransubproteom des EGD Wildtypstammes und dem einer *prfA*-Deletionsmutante von *L. monocytogenes* durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die 16BAC/SDS-PAGE zur Analyse der aufgereinigten Membranfraktionen der beiden Stämme eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Methode nur mäßig für vergleichende Expressionsanalysen geeignet ist. Aufgrund unterschiedlicher horizontaler Schlierenbildung und teilweise schlecht fokussierter Proteinspots war eine genaue Quantifizierung der Proteine unmöglich. Mit dieser Methode konnten daher auch keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Listerienstämmen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Der gellose Ansatz erwies sich ebenfalls als ungeeignet für die Analyse der PrfA-regulierten Membranproteine. Hier trat das Problem einer unterschiedlichen Membranstabilität während der Trypsinbehandlung auf. Bei dem EGD Wildtypstamm konnte schon nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C eine Auflösung der Lipiddoppelschicht beobachtet werden, während bei der *prfA*-Deletionsmutante noch nach der Trypsinbehandlung über Nacht ein sichtbares Membranpellet durch Ultrazentrifugation abgesetzt werden konnte. Daher bestand bei der *prfA*-Deletionsmutante die Gefahr, dass nur die außerhalb der Lipiddoppelschicht präsentierten und somit dem Trypsin zugänglichen Proteinfragmente enzymatisch gespalten werden. Die generierten Peptide der Deletionsmutante wären in einem solchen Fall nicht vergleichbar mit den Peptiden des Wildtypstammes gewesen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ausgangsbedingungen bei der Trypsinbehandlung, die u.a. wahrscheinlich auf die An- bzw. Abwesenheit der PrfA-regulierten Phospholipasen (PlcA, PlcB) zurückzuführen sind, wurde auf eine weitere Methode zur Analyse der Membranfraktion zurückgegriffen. Bei dieser Methode wurden die Proteine zunächst mit Hilfe des stark anionischen Detergens SDS aus der Membranfraktion isoliert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch einen „In-Gel-Verdau“ enzymatisch gespalten und die generierten Peptide über LC-MS/MS identifiziert. Um eine möglichst große Anzahl verschiedener Peptide analysieren zu können, wurden die Gelbahnen vor dem „In-Gel-Verdau“ in drei gleichgroße Stücke aufgeteilt (Abb. 3.2).

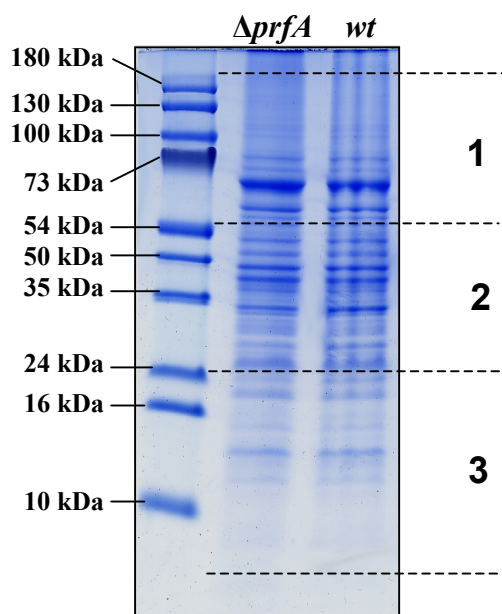


Abbildung 3.2: Vergleich des Membran-subproteoms unterschiedlich PrfA exprimierender Stämme.

Die Proteine wurden aus aufgereinigten Membranfraktionen der *prfA*-Deletionsmutante ($\Delta prfA$) und des EGD Wildtypstammes (*wt*) isoliert und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Visualisierung der Proteinbanden mittels kolloidalem Coomassie wurden die drei Proteinspuren aus dem Gel ausgeschnitten und an den markierten Stellen in jeweils drei Teilstücke unterteilt. Die Teilstücke wurden über Nacht mit Trypsinlösung behandelt und die generierten Peptide mittels LC-MS analysiert.

Insgesamt konnten mit Hilfe dieser Methode 87 Proteine sicher identifiziert werden, wobei 43 dieser Proteine zuvor weder mit Hilfe der 16BAC/SDS-PAGE noch mit Hilfe des gellosen Ansatzes nachgewiesen werden konnten. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich mehrere Proteine, für die bis zu 12 Transmembrandomänen vorhergesagt werden.

Durch die Kombination aus SDS-PAGE und LC-MS/MS-Analyse war es jedoch nicht nur möglich, eine hohe Anzahl hydrophober Proteine zu identifizieren, sondern es konnten im Gegensatz zu der gellosen Analyse auch Informationen über den Fragmentierungszustand der Proteine gewonnen werden. So wurden z.B. in der Fraktion 3 (8-24 kDa) Peptide von Proteinen nachgewiesen, deren theoretisches Molekulargewicht weit über 24 kDa liegt. Zu diesen Proteinen gehören OppA, Lmo2403, TcsA, AtpD und Lmo0953.

Im Bandenmuster der aufgetrennten Membranproteine des EGD Wildtypstammes und der $\Delta prfA$ -Mutante sind keine deutlichen Unterschiede zu sehen (Abb. 3.2). Erst mit Hilfe der anschließenden LC-MS/MS-Analyse konnten einige zusätzliche Proteine in der Membranfraktion des EGD Wildtypstammes identifiziert werden. In der Tabelle 3.3 sind die Proteine aufgeführt, von denen gleich mehrere Peptide exklusiv nur in der Membranfraktion des EGD Wildtypstammes nachgewiesen werden konnten. Zwei dieser proteinkodierenden Sequenzen (lmo2219, *atpD*) weisen in ihrer Promotorregion eine mögliche PrfA-Box auf.

In der Membranfraktion der $\Delta prfA$ -Mutante konnten keine zusätzlichen Proteine mit mehr als zwei Peptiden identifiziert werden.

Tabelle 3.3: Putativ PrfA-regulierte Membranproteine. In der Tabelle sind die Proteine aufgelistet, die mit mehr als zwei Peptiden ausschließlich in der Proteinspur des EGD Wildtypstammes der Abbildung 3.2 nachgewiesen werden konnten. In der Spalte (**P**) ist die Anzahl der identifizierten Peptide pro Protein angegeben. Die Vorhersage einer möglichen **PrfA-Box** richtet sich nach den Angaben von Glaser et al. (2001), bei der bis zu zwei „Nukleotid-Mismatches“ in der palindromischen Sequenz zugelassen sind.

Gen	Funktion	P	PrfA-Box
Fraktion 1 (~55kDa-200kDa)			
lmo0355	Homolog zu Flavocytochrom C-Fumaratreduktasekette A	3	nein
lmo1527	Homolog zu SecDF	4	nein
Fraktion 2 (~24kDa-55kDa)			
lmo2219	Homolog zu Posttranslokationschaperon PrsA von <i>B. subtilis</i>	3	ja
<i>atpD</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (beta Kette)	8	ja
Fraktion 3 (~8kDa-24kDa)			
lmo1649	Unbekannt	7	nein
<i>mscL</i>	Homolog zu Mechanosensitiven Kanal	4	nein
<i>atpF</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (b-Kette)	4	nein

Insgesamt konnten mit Hilfe der 16BAC/SDS-PAGE, dem gellosen Ansatz und der Kombination aus SDS-PAGE und LC-MS/MS-Analyse 103 Proteine aus der aufgereinigten Membranfraktion von *L. monocytogenes* identifiziert werden. Für 39 dieser Proteine wurden von Arai et al. (2002) eine oder mehrere putative Transmembrandomänen vorhergesagt (Gruppe der integralen Membranproteine), weitere 38 dieser Proteine wurden aufgrund ihrer Funktion bzw. hohen Homologie zu bereits identifizierten Proteinen anderer Organismen in die Gruppe der membranassoziierten Proteine eingestuft (Gruppe2), 3 dieser Proteine konnten zwar in keine der zuvor genannten Gruppen eingeordnet werden, enthielten jedoch ein putatives Signalpeptid, wodurch ihre Membranlokalisation erklärt werden könnte (Gruppe 3), bei 6 Proteinen konnte aufgrund ihrer unbekannten Funktion keine genaue Aussage zu der Membranzugehörigkeit getroffen werden (Gruppe 4), und 17 Proteine wurden in die Gruppe 5 der möglichen Verunreinigungen eingeordnet. Eine Auflistung dieser Proteine ist im Anhang in der Tabelle 8.1 zu finden. Der hohe Anteil an integralen Membranproteinen und an membranassoziierten Proteinen (75%) bestätigt die Effektivität der beschriebenen Anreicherungsmethode.

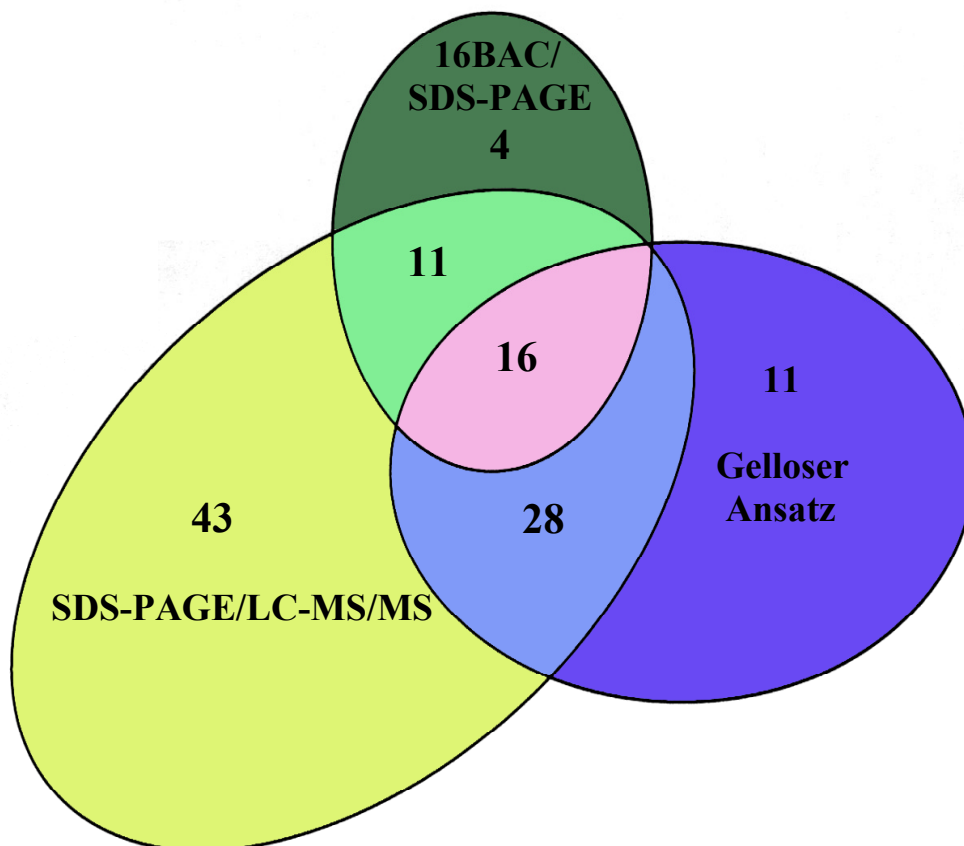


Abbildung 3.3: Anteil der drei Methoden an der Identifizierung von insgesamt 103 Proteinen der aufgereinigten Membranfraktion von *L. monocytogenes*.

3.2. Analyse listerieller Lipoproteine

Obwohl die Lipoproteine eine besonders interessante Gruppe der membranassoziierten Proteine darstellen, war zu Beginn dieser Arbeit nur wenig über die Expression und die Bedeutung dieser Proteingruppe an dem Infektions- und Lebenszyklus des intrazellulären Erregers bekannt. Um mehr über die listeriellen Lipoproteine in Erfahrung zu bringen, wurde im Verlauf der Arbeit eine detaillierte Analyse dieser Proteingruppe durchgeführt. Ein Ziel dabei war, die Gruppe der putativ lipidmodifizierten Proteine durch eine Überprüfung der Annotierung genau einzugrenzen und anschließend die dominantesten Lipoproteine von *L. monocytogenes* experimentell zu verifizieren.

3.2.1. Annotierung der Lipoproteine von *L. monocytogenes*

Aufgrund neuer Erkenntnisse bei der Annotierung von Lipoproteinen grampositiver Bakterien (Sutcliffe et al., 2002) wurde die vorherige Annotierung der listeriellen Lipoproteine von Glaser et al. (2001) auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Die Überprüfung der Daten erfolgte mit Hilfe des im Internet frei zugänglichen Programms PROSITE (www.expasy.ch/prosite). Hierbei wurde sowohl das von Sutcliffe et al. entwickelte Suchmuster als auch das PS00013-Suchmuster, das von PROSITE als allgemeines Suchmuster für prokaryotische Lipoproteine angegeben wird, verwendet.

Mit Hilfe des Suchmusters von Sutcliffe et al. konnten insgesamt 58 Lipoproteine für *L. monocytogenes* ermittelt werden, während mit Hilfe des PS00013-Suchmusters 17 zusätzliche Lipoproteine vorhergesagt wurden. Um „falsch positiv“ annotierte Lipoproteine auszuschließen, wurden die Signalsequenzen der annotierten Lipoproteine im Einzelnen mit SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) analysiert. Als „falsch positiv“ wurden die Sequenzen deklariert, die N-terminal keinen hydrophoben Bereich aufzeigten, ebenso wie die Sequenzen, bei denen das Cystein der Lipobox deutlich innerhalb anstatt am Ende der hydrophoben Region lokalisiert war.

Von den 17 zusätzlichen Kandidaten des PS00013-Suchmusters wurden sieben Kandidaten (NadB, Lmo1136, Lmo0269, lmo2687, Lmo1508, Lmo2172, Lmo2793) als „falsch positiv“ gewertet und zehn Kandidaten (Lmo0510, Lmo1653, Lmo0935, Lmo2446, Lmo2431, lmo2499, Lmo0460, Lmo2595, OpucC, Lmo1340) als putative Lipoproteine eingestuft.

Insgesamt wurden auf diese Weise 68 putative Lipoproteine für *L. monocytogenes* vorhergesagt (Tab. 8.2, Anhang). Ein Vergleich mit den von Glaser et al. vorhergesagten 68 Lipoproteinen offenbarte zwei Unterschiede zu der früheren Annotierung. Zum einen wurde das von Glaser et al. annotierte Protein Lmo0810 als „falsch positiv“ deklariert. In der Lipobox des Signalpeptides von Lmo0810 ist kein Cystein zu finden, so dass eine Lipidmodifizierung dieses Proteins ausgeschlossen werden kann. Zum anderen wurde in der neuen Liste Lmo1340 als zusätzliches putatives Lipoprotein von *L. monocytogenes* aufgeführt. Die Funktion von Lmo1340 ist bisher unbekannt, jedoch weist dieses Protein eine hohe Homologie zu dem YpgU- Protein von *B. subtilis* auf, das bei dieser Bakterienart ebenfalls als Lipoprotein annotiert wurde.

Die Lipobox-Konsensussequenz der speziell für *L. monocytogenes* vorhergesagten 68 Lipoproteine ist in Abbildung 3.4. dargestellt. Auffällig bei dieser Darstellung ist, dass zum einen an der -2 Position verhältnismäßig häufig die Aminosäure Threonin anzutreffen ist. Laut Literatur treten an dieser Position normalerweise überwiegend die Aminosäuren Alanin und Serin auf (Hayashi und Wu, 1990, Sutcliffe et al., 2002). Zum anderen scheint ebenfalls das Glycin an der +2 Position der Schnittstelle des Signalpeptides sehr konserviert zu sein.



Abbildung 3.4: Sequenzlogo mit der Lipobox-Konsensussequenz von *L. monocytogenes*.

Das Sequenzlogo wurde mit Hilfe von Seqlogo (<http://www.bio.cam.ac.uk/cgi-bin/seqlogo/logo.cgi>) unter Einbeziehung der in Tabelle 8.2 aufgeführten 68 putativen Lipoproteine erstellt. Die relative Größe der Buchstaben reflektiert die Häufigkeit, mit der die jeweiligen Aminosäuren an den 5 verschiedenen Positionen der Konsensussequenz anzutreffen sind.

3.2.2. Identifizierung von Lipoproteinen mittels radioaktiv markierter Fettsäuren

Zum experimentellen Nachweis von Lipoproteinen wurde zunächst eine Kennzeichnung der Proteine mit Hilfe von radioaktiv markierten Fettsäuren durchgeführt. *L. monocytogenes* wurde dazu sowohl in BHI als auch in Minimal-Medium unter Zugabe von ^3H -Palmitinsäure angezogen. Nach Aufschluss der Zellen und Anreicherung der Membranfraktion mittels differentieller Zentrifugation wurden die Proteine durch eine Chloroform/Methanol-Behandlung extrahiert und über eine eindimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Um die Esterverbindung zwischen den Fettsäuren und dem Glycerinrest des Lipidankers zu schützen, wurde die SDS-PAGE in Abwesenheit von β -Mercaptoethanol durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden schließlich auf einer PVDF-Membran transferiert und mit Hilfe eines TLC-Scanners analysiert.

Wie in der Abbildung 3.5 zu sehen ist, wurden in unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen Proteine mit Hilfe der ^3H -Palmitinsäure radioaktiv markiert. Der Vergleich der beiden Kulturbedingungen zeigte, dass der Einbau der ^3H -Palmitinsäure abhängig von dem jeweiligen Medium ist, in dem die Bakterien angezogen wurden. So konnte bei der Anzucht im Minimal-Medium eine zusätzliche Markierung bei ~ 43 kDa als auch bei ~ 32 kDa detektiert werden, während bei der Anzucht in BHI sowohl bei ~ 55 kDa als auch im Bereich um 20-30 kDa zusätzliche Proteinbanden markiert wurden.

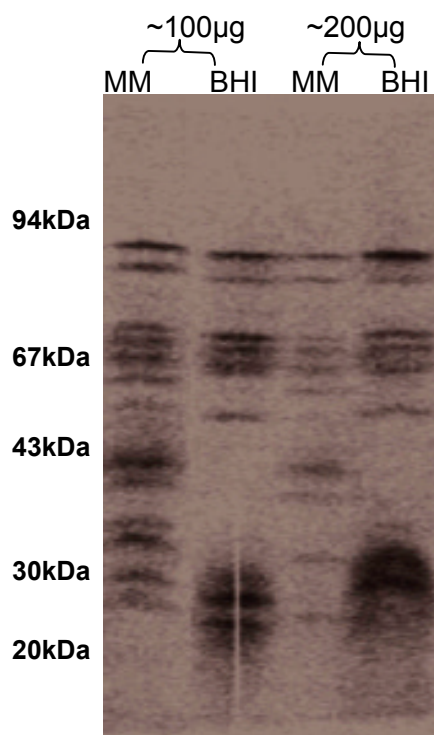


Abbildung 3.5 : Radioaktive Markierung von Lipoproteinen. Radioaktiv markierte Lipoproteine wurden aus den grampositiven Bakterien isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt (100µg bzw. 200µg Gesamtprotein) und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der radioaktiv markierten Proteinbanden erfolgte mit Hilfe eines TLC-Scanners. Verglichen wurde der Einbau der ^3H -Palmitinsäure unter zwei verschiedenen Kulturbedingungen: Anzucht der Bakterien in BHI (BHI) und in Minimal-Medium (MM).

Da viele der vorhergesagten Lipoproteine ähnliche Molekulargewichte besitzen (siehe Tabelle 8.2, Anhang), wäre auch mit Hilfe der MS-Analyse keine eindeutige Identifizierung der radioaktiv markierten Proteinbanden möglich gewesen. Deshalb wurde eine zweidimensionale Auftrennung der markierten Proteine über die hochauflösende IEF/SDS-PAGE angestrebt. Um zu untersuchen, ob die 2D-PAGE zur Auftrennung der entsprechenden Fraktion geeignet ist, wurde zunächst eine Testreihe ohne den Einsatz von Radioaktivität durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass einige Probleme hinsichtlich der isoelektrischen Fokussierung der Proteinfraction auftreten. Trotz einer relativ hohen Proteinbeladung der IPG-Streifen (~300µg) konnten in An- und in Abwesenheit von DTT im Probenpuffer nach der zweidimensionalen Auftrennung nur einige wenige, schlecht fokussierte Proteinspots mit Hilfe der sensitiven RuBPS-Färbung visualisiert werden (Abb. 3.6). Dies deutete darauf hin, dass die Proteine vermutlich aufgrund ihres hydrophoben Lipidankers zum einen nicht ausreichend in die rehydrierten Gelstreifen einwandern konnten und zum anderen nur schlecht fokussiert werden konnten.

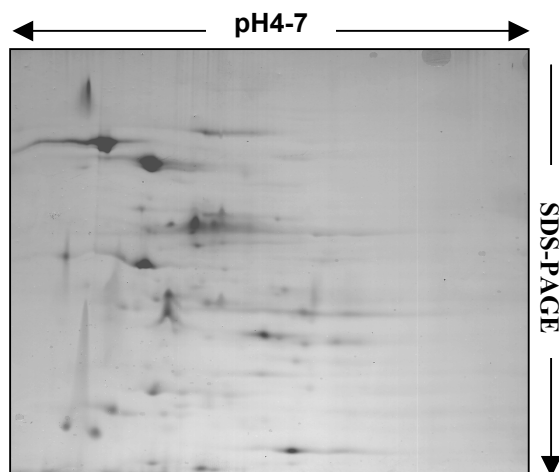


Abbildung 3.6 : Zweidimensionale Auftrennung der Lipoproteinfraction. Eine Auftrennung der Lipoproteinfraction mittels der 2D-PAGE erwies sich als problematisch. In dem fluoreszenzgefärbten Gel sind nur wenige, schlecht fokussierte Proteinspots zu erkennen.

3.2.3. Identifizierung von Lipoproteinen durch Inhibierung der Lipidmodifizierung

Aufgrund der Probleme, die bei der 2D-PAGE der radioaktiv markierten Lipoproteine bestanden, wurde zum experimentellen Nachweis dieser Proteingruppe auf eine alternative Methode zurückgegriffen, die ursprünglich von Antelmann et al. (2001) zur Untersuchung von Lipoproteinen des Modellorganismus *B. subtilis* entwickelt wurde. Bei dieser Methode erfolgte die Identifizierung der Lipoproteine durch eine Inhibierung der Lipidmodifizierung,

die durch die Konstruktion einer Prälipoprotein-Diacylglyceryltransferase(*lgt*)-Deletionsmutante erreicht wurde. Lgt katalysiert den Transfer des Diacylglycerylrestes („Lipidanker“) zu der SH-Gruppe des in der Lipobox befindlichen Cysteins der Prälipoproteine.

3.2.3.1 Herstellung und Komplementation einer chromosomalen *lgt*-Deletionsmutante von *L. monocytogenes*

Die Suche nach dem Lgt-kodierenden Gen in der Listeria-Genomdatenbank (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>) ergab einen offenen Leserahmen mit einer Länge von 834 Basenpaaren. Die flankierenden Gene (Abb. 3.7) kodieren für eine Acetyltransferase (Lmo2480), ein Homolog zu der *B. subtilis* P-Ser-HPr-Phosphatase (Lmo2481), eine HPr-P(Ser)-Kinase/Phosphatase (Lmo2483) und vier Proteine unbekannter Funktion (Lmo2482, Lmo2485, Lmo2486, Lmo2487).

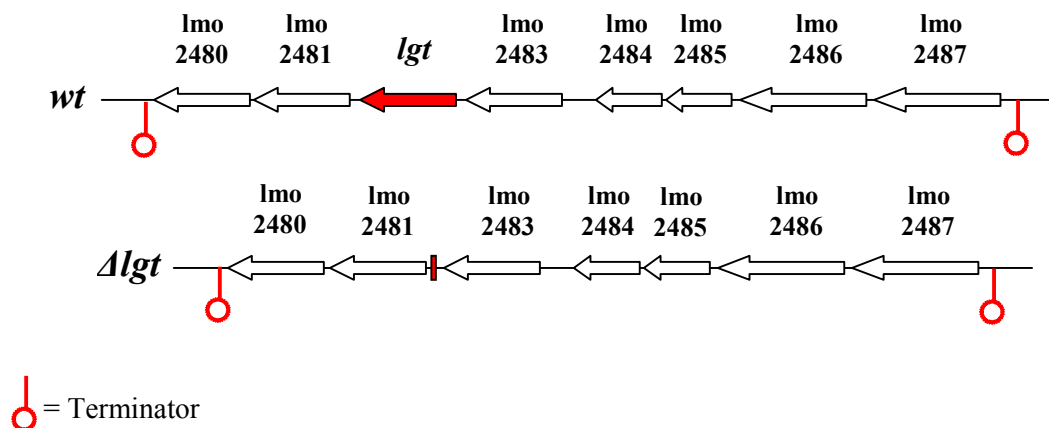


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der genetischen Organisation des *lgt*-Locus in dem EGD Wildtypstamm (*wt*) und der Δlgt -Mutante (Δlgt) von *L. monocytogenes*. Das *lgt*-Gen ist durch einen roten Pfeil dargestellt. Die anderen Pfeile zeigen die Positionen der *lgt*-flankierenden Gene an.

Um die nachgeschalteten Gene nicht zu beeinflussen, wurden bei der *lgt*-Deletionsmutante 822bp der 834bp ohne die Verschiebung des Leserasters („in frame“) deletiert. Dazu wurden die *lgt*-flankierenden Bereiche in einer PCR mit dem EGD Wildtypstamm als Matrize amplifiziert und mittels einer eingebauten XbaI-Schnittstelle ligiert. Das 817bp große Ligationsprodukt wurde in den zwischengeschalteten pCR-Blunt II-TOPO-Vektor und

anschließend in den temperatursensitiven Shuttle-Vektor pAUL-A kloniert. Nach seiner Vervielfältigung in *E. coli* wurde das rekombinante Plasmid in den EGD Wildtypstamm von *L. monocytogenes* transformiert. Dort erfolgte durch homologe Rekombination bei einer Temperatur von 42°C die Integration des Plasmids in das Chromosom von *L. monocytogenes*. Die Exzision des temperatursensitiven Plasmids, das entweder das Ligationsfragment oder aufgrund eines Allelaustausches das wildtypische Gen enthielt, wurde durch eine Temperatursenkung auf 28°C über Nacht erzielt.

Die erhaltenen Klone wurden in einer PCR mit den Oligonukleotiden Lgt1-F und Lgt4-R auf die Deletion überprüft, wobei der EGD Wildtypstamm als Kontrolle diente. Bei der *lgt*-Deletionsmutante wurde ein 817bp großes PCR-Produkt und beim Wildtyp ein 1639bp großes Fragment erwartet (Abb.3.8). Zur Absicherung der Deletionssequenz wurde eine DNA-Sequenzierung des Fragments durchgeführt.

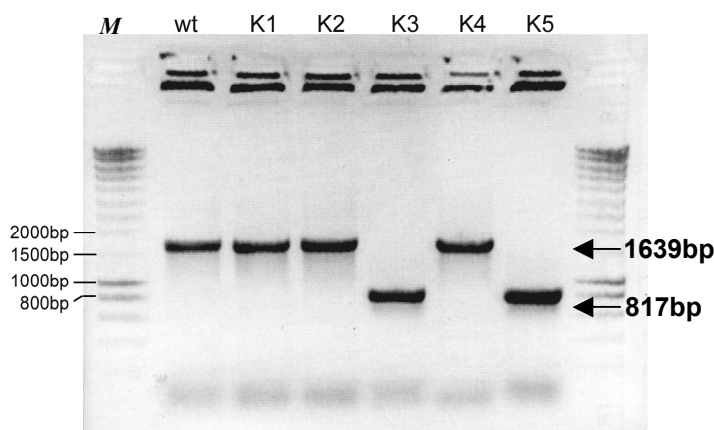


Abbildung 3.8.: Überprüfung verschiedener Klone auf die *lgt*-Deletion. Die Überprüfung der Deletion erfolgte mit Hilfe einer PCR-Reaktion unter Verwendung der Oligonukleotiden Lgt1-F und Lgt4-R und dem EGD Wildtypstamm als Kontrolle (*wt*). Bei den Klonen K3 und K5 konnte ein Fragment in der entsprechenden Größe von 817bp amplifiziert werden. M= Marker

Um einen eindeutigen Nachweis dafür zu erbringen, dass die Deletion des *lgt*-Gens ohne die Beeinflussung eventuell nachgeschalteter Gene erfolgte, wurde eine genetische Komplementation der Deletion durchgeführt. Dazu wurde das deletierte Gen in einer PCR mit den Oligonukleotiden Lgt5-F(Nde1) und Lgt6-R(Sal1) und dem EGD Wildtypstamm als Matrize amplifiziert und anschließend in den Liga157-Vektor mit integriertem ActA-Promotor kloniert. Nach der Vervielfältigung des rekombinanten Plasmids in *E. coli* und einer Überprüfung der *lgt*-Sequenz mittels DNA-Sequenzierung wurde das rekombinante Plasmid in den Deletionsstamm transformiert.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Transformation wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden 3Primpl1 und Lgt6-R(Sal1) durchgeführt, wobei ein PCR-Produkt von 1081bp (*lgt* + ActA-Promotor) amplifiziert wurde.

Zur Stabilisierung des Plasmides musste die weitere Kultivierung der komplementierten Mutante in Anwesenheit von Erythromycin erfolgen. Da hierbei ein Einfluss des Erythromycins auf die Proteinexpression nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde zur Schaffung gleicher Ausgangsbedingungen der Liga157-Vektor (ohne *lgt*-Insert) sowohl in den EGD Wildtypstamm als auch in die *lgt*-Deletionsmutante transformiert. In diesem Fall erfolgte die Kontroll-PCR mit Hilfe der Oligonukleotide 3Primp11 und 5Primp12, wobei jeweils ein 332bp großes Fragment amplifiziert wurde.

3.2.3.2. Wachstumskurven des Wildtypstammes, der *lgt*-Deletionsmutante und der komplementierten Mutante im Vergleich

Mit Hilfe einer Wachstumskurve sollte zunächst untersucht werden, ob die Deletion der Prälipoprotein-Diacylglyceryltransferase einen Einfluss auf die allgemeine Vitalität und Vermehrungsfähigkeit der Bakterien hat. Dazu wurden der EGD Wildtypstamm und die Δlgt -Mutante in BHI bei 37°C im Schüttelinkubator angezogen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die optische Dichte bei 600nm bestimmt. Wie in der Abbildung 3.9 zu sehen ist, konnte kein Unterschied im Verlauf der zwei Wachstumskurven detektiert werden. *Lgt* ist somit nicht essentiell für das Überleben und die Vermehrung der Bakterien.

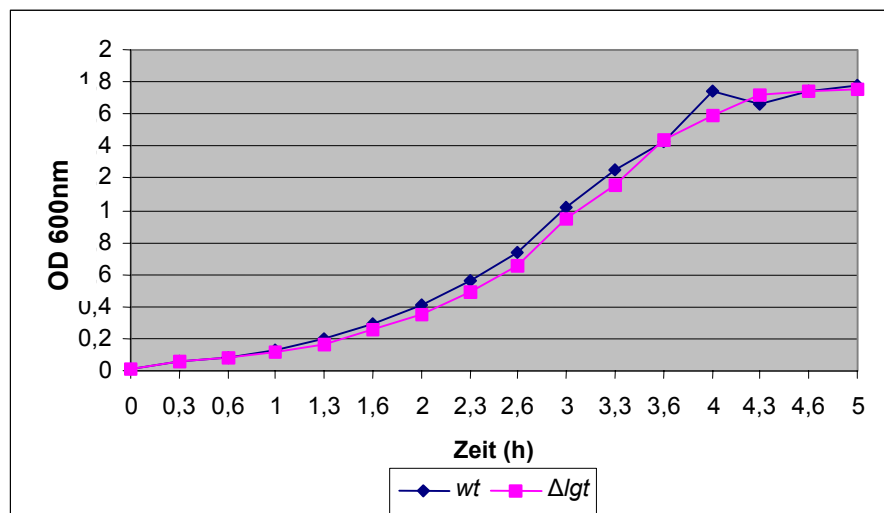


Abbildung 3. 9 : Wachstumskurven des EGD Wildtypstammes und der *lgt*-Deletionsmutante. Die Kultivierung der Bakterien wurde in BHI bei 37°C im Schüttelinkubator durchgeführt.

Weiterhin wurde eine Wachstumskurve der drei Transformationsstämme (*wt* Liga157; Δ *lgt* Liga157; Δ *lgt* Liga157(*lgt*)) in BHI bei 37°C erstellt (Abb. 3.10). Auch bei diesen drei Stämmen konnte kein Unterschied im Verlauf der drei Wachstumskurven festgestellt werden, so dass in den folgenden Untersuchungen von den gleichen Ausgangsbedingungen ausgegangen werden konnte.

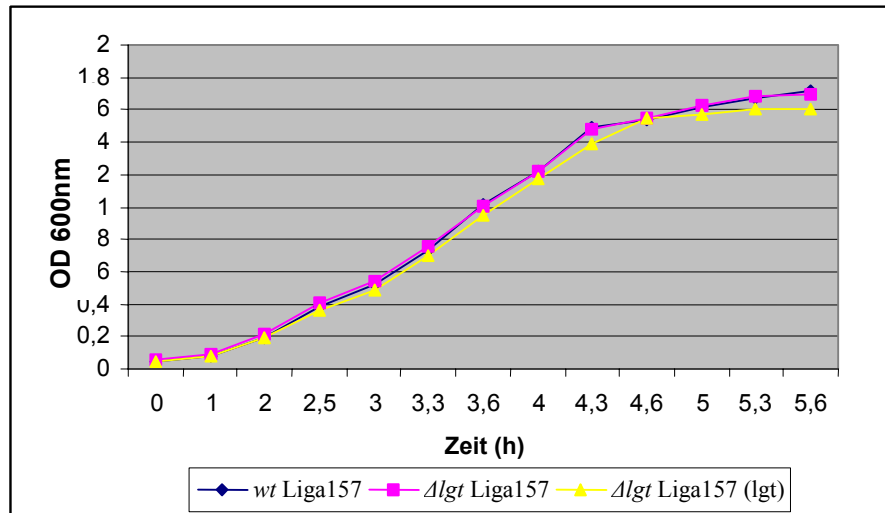


Abbildung 3. 10 : Wachstumskurven des *wt* Liga157-Stammes, des Δ *lgt* Liga157 Stammes und der komplementierten Mutante. Die Kultivierung der Bakterien wurde in BHI bei 37°C im Schüttelinkubator durchgeführt.

3.2.3.3. Vergleichende Sekretomanalysen des Wildtypstammes, der Δ *lgt*-Mutante und der komplementierten Mutante

Ohne die Lipidmodifikation der Prälipoproteine, die durch die Prälipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase katalysiert wird, können die Proteine nicht in der Zellmembran verankert werden. Dieses führt nach Antelmann et al. (2001) zu einer verstärkten Abgabe der Prälipoproteine an das umgebende Medium der Bakterien (Abb.3.11).

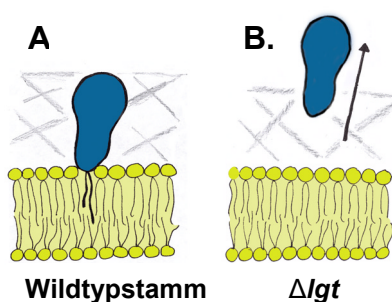


Abbildung 3.11 : Modell der Lipoprotein-freisetzung bei der *lgt*-Deletionsmutante. Während die Lipoproteine normalerweise über eine Diacylglyceryl-Modifikation mit der Zellmembran assoziiert sind (A), kommt es bei der Δ *lgt*-Mutante aufgrund des fehlenden Lipidankers zur Freisetzung der Lipoproteine an das umgebende Medium (B).

Zum experimentellen Nachweis der Lipoproteine kann daher ein Vergleich der extrazellulären Proteine des Wildtypstammes und der Δlgt -Mutante durchgeführt werden. Da bei den verstärkt im Medium der Δlgt -Mutante zu erwartenden Lipoproteine kein hydrophober Anker vorhanden war, konnte in diesem Fall die Auftrennung des Proteingemisches problemlos über die hochauflösende 2D-PAGE erfolgen.

Vor der Auftrennung wurde eine theoretische 2D-Karte der putativen Lipoproteine (ohne Signalsequenz) erstellt. Wie in der Abbildung 3.12 zu sehen ist, wurde für den Großteil der putativen Lipoproteine ein pI im Bereich von pH 4-6 errechnet. Da nur für drei Proteine (Lmo2349, Lmo1903, OpucC) ein theoretischer pI-Wert im basischen pH-Bereich ermittelt werden konnte, wurden für die Analyse der extrazellulären Proteine zunächst IPG-Streifen mit einem pH-Bereich 4-7 ausgewählt.

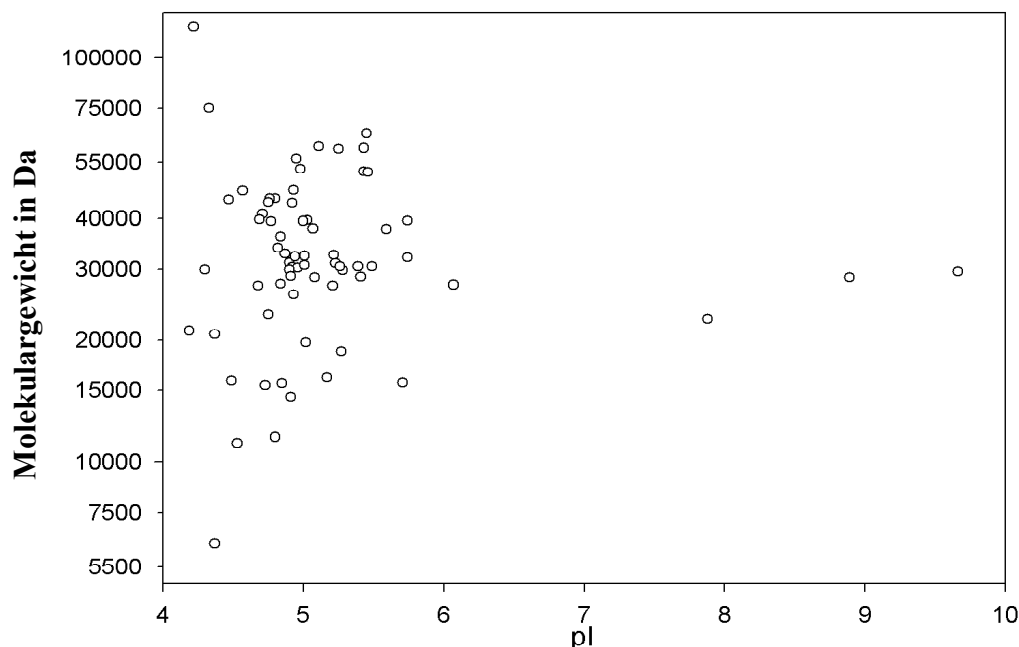


Abbildung 3.12: Theoretische 2D-Karte der 68 putativen Lipoproteine. Die Molekulargewichte und pI-Werte der prozessierten Lipoproteine wurden mit Hilfe von ProtParam ermittelt.

Für die vergleichende Sekretomanalyse wurden die drei Transformations-Stämme (*wt* Liga157; Δlgt Liga157; komplementierte Mutante) parallel in filtriertem BHI angezogen. Nach der zweidimensionalen Auftrennung der extrazellulären Proteine und der Visualisierung der Proteinspots mittels Fluoreszenzfärbung folgte die Auswertung der Gele mit Hilfe der Software Proteomweaver 2.0 (Definiens). Ein Vergleich des extrazellulären Proteoms der Deletionsmutante und des transformierten Wildtypstammes offenbarte deutlich sichtbare Unterschiede (Abb. 3.13). So waren bei der Deletionsmutante gleich mehrere Proteinspots

detektierbar, die bei dem Wildtypstamm entweder nur in sehr geringen Volumina vorlagen oder sogar vollständig abwesend waren. Die MS-Analyse von 22 dieser Proteinspots führte zu der Identifizierung von 12 verschiedenen Proteinen. Alle identifizierten Proteine wiesen ein lipoproteinspezifisches Signalpeptid auf und waren somit in der Liste der 68 putativen Lipoproteine wiederzufinden.

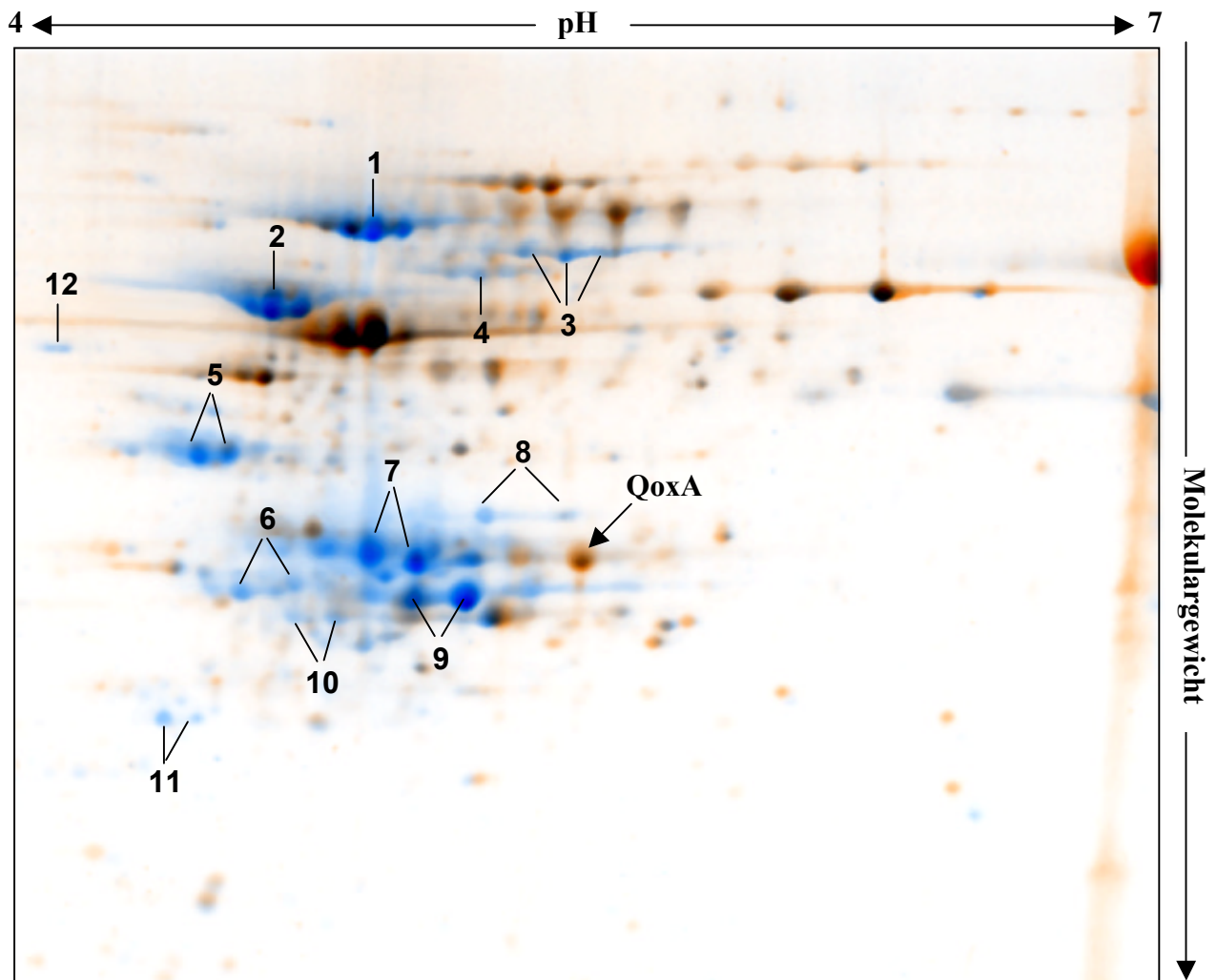


Abbildung 3.13 Vergleich des extrazellulären Proteoms des Δlgt Liga157-Stammes (blau) und des *wt* Liga157-Stammes (rot). *L. monocytogenes* wurde in BHI bis zum Erreichen der stationären Phase angezogen und die im Kulturüberstand befindlichen Proteine über eine 2D-PAGE aufgetrennt. Nach Visualisierung der Proteine mittels Fluoreszenzfärbung wurden die beiden Proteinmuster mit Hilfe der Software Proteomweaver 2.0 (Definiens) übereinandergelegt. Schwarz gefärbte Spots stellen Proteine dar, die in vergleichbaren Mengen in beiden Proteinmustern vorkommen. Bei den blau gefärbten Spots handelt es sich um Proteine, die bei dem Wildtypstamm entweder gar nicht oder in deutlich geringeren Mengen im extrazellulären Proteom vorliegen. Die MS-Analyse 22 dieser Proteinspots zeigte, dass es sich bei diesen Proteinen ausschließlich um Proteine handelt, die ein lipoproteinspezifisches Signalpeptid besitzen. Die identifizierten Proteine sind in der Tabelle 3.4 (Seite 78) zusammengestellt.

In der Abbildung 3.13 sind einige orange gefärbte Spots zu erkennen, was in diesem Fall allerdings nicht auf eine Hochregulation der Proteine in dem Wildtypstamm zurückzuführen ist. Eine genaue Analyse von sieben Gelsätzen zeigte, dass auch in dem extrazellulären Proteom der Mutante an den entsprechenden Stellen Proteinspots detektierbar sind. Da diese Proteine jedoch bei der Mutante einen viel geringeren Anteil an der Gesamtproteinmenge ausmachten und die Analysen mit vergleichbaren Gesamtproteinmengen ($\sim 300\mu\text{g}$) durchgeführt wurden, befanden sich diese Spots bei der Mutante an der Detektionsgrenze, während sie bei dem Wildtypstamm noch deutlich sichtbar waren. Exklusiv vorkommende oder eindeutig hochregulierte Proteinspots konnten in dem Proteinmuster des *wt* Liga157-Stammes nicht analysiert werden.

Unter den nicht regulierten Proteinen befand sich ein Proteinspot, der als Quinoloxidase-untereinheit II (QoxA) identifiziert wurde (Abb.3.13). Bei diesem Protein handelt es sich um ein hoch konserviertes Protein, das von Ma et al. (1997) bereits bei *E. coli* experimentell als Lipoprotein nachgewiesen werden konnte. Da die Lipobox von QoxA auch bei *L. monocytogenes* konserviert vorlag, war es relativ unwahrscheinlich, dass dieses Protein bei *L. monocytogenes* nicht durch Lgt modifiziert wird. Durch den Vergleich des theoretischen mit dem experimentell ermittelten Molekulargewichtes konnte festgestellt werden, dass es sich bei dem Proteinspot lediglich um ein ca.10 kDa kleineres Fragment handelte. Eine Analyse der Aminosäuresequenz von QoxA offenbarte zwei zusätzliche Transmembran-domänen, die kurz hinter dem Signalpeptid lokalisiert sind (Abb. 3.14). Mit Hilfe einer N-terminalen Sequenzierung des Proteinspots konnte schließlich die Vermutung bestätigt werden, dass QoxA sowohl bei der Deletionsmutante als auch bei dem Wildtypstamm direkt hinter der zweiten Transmembrandomäne (nach 112 Aminosäuren) proteolytisch gespalten wurde.

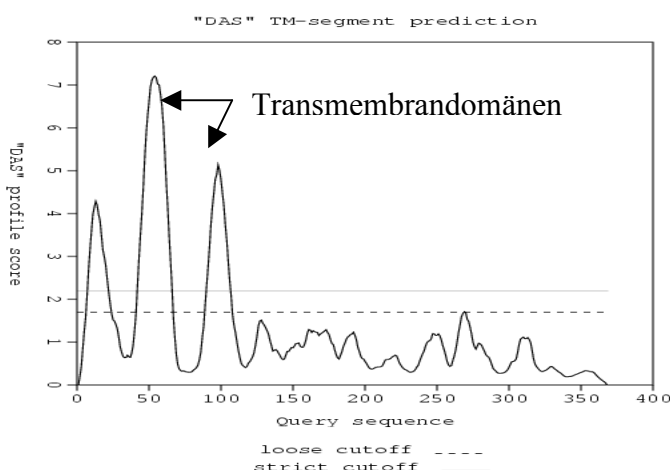


Abbildung 3. 14 : Darstellung der zwei Transmembrandomänen von QoxA. Mit Hilfe des im Internet freizugänglichen DAS-Programms (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) wurde die Aminosäuresequenz von QoxA auf hydrophobe Bereiche hin untersucht.

Ein Vergleich der extrazellulären Proteinexpression des transformierten Wildtypstammes und der komplementierten Mutante ist in der Abbildung 3.15 dargestellt. Die Proteinmuster der beiden Stämme sind nahezu identisch. Durch die genetische Komplementation konnte somit das Proteinmuster des extrazellulären Proteoms des Wildtypstammes wiederhergestellt werden.

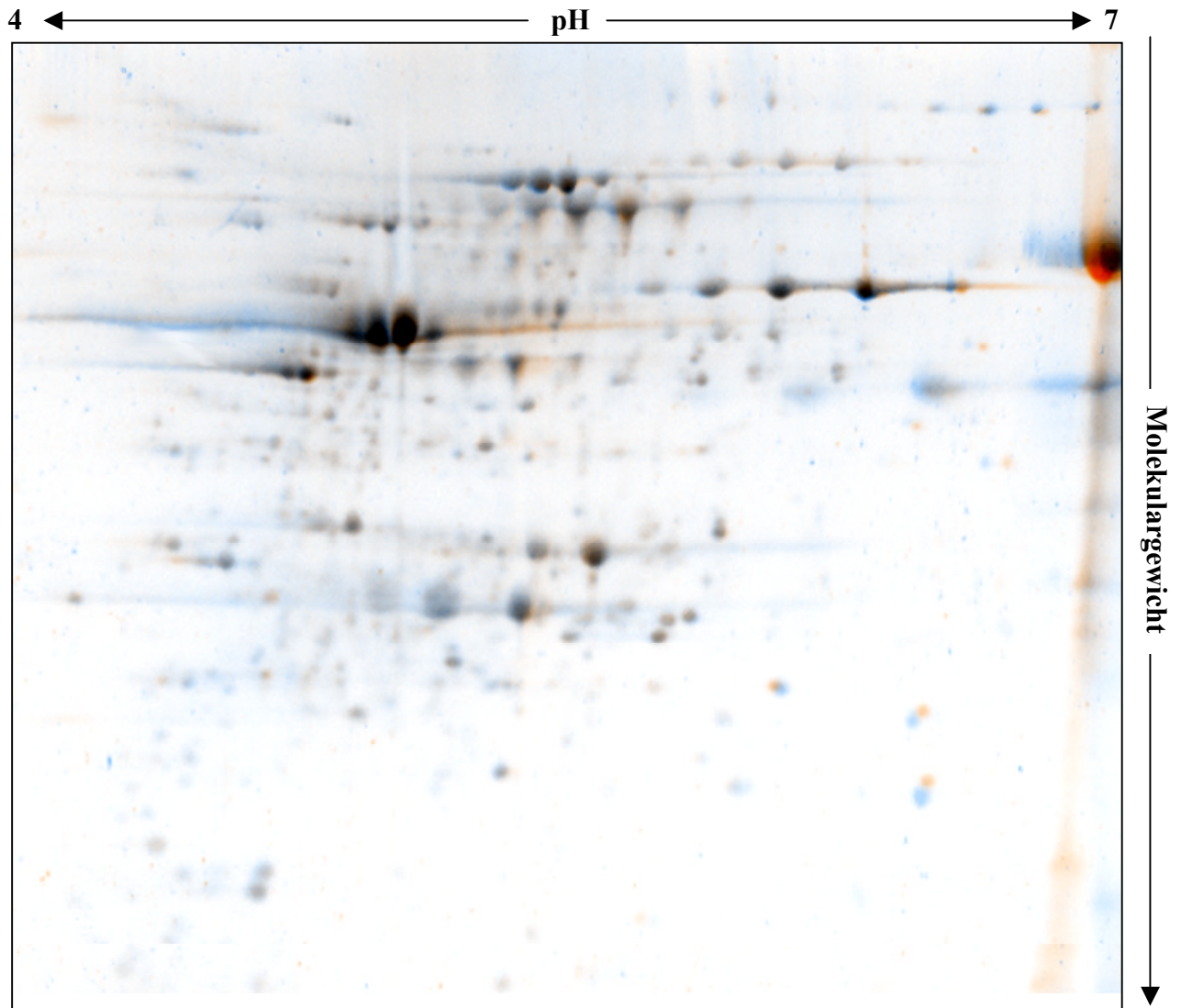


Abbildung 3. 15 : Vergleich des extrazellulären Proteoms der komplementierten Mutante (blau) und des *wt* Liga157-Stammes (rot). Die beiden Proteinmuster wurden mit Hilfe der Software Proteomweaver 2.0 (Definiens) übereinander gelegt. Die schwarz gefärbten Spots stellen Proteine dar, die in vergleichbaren Mengen in beiden Proteinmustern vorkommen. Es sind keine Unterschiede zwischen den beiden Varianten zu entdecken. Durch die genetische Komplementation konnte somit das Proteinmuster des extrazellulären Proteoms des Wildtypstammes wiederhergestellt werden.

Wie bereits aufgrund der theoretischen 2D-Karte zu erwarten war und durch die 2D-Analysen bestätigt wurde, kam es insbesondere in dem Bereich um 30kDa und pH 4,5-5,5 zu starken Überlagerungseffekten der Lipoproteine. Um in diesem Bereich eine bessere Auftrennung der Proteine zu erzielen und somit weitere Lipoproteine identifizieren zu können, wurden sogenannte Zoomgele mit sehr engen pH-Bereichen erstellt (Abb. 3.16).

Insgesamt konnten mit dieser Methode 12 weitere Lipoproteine experimentell nachgewiesen werden. Unterschiede in dem extrazellulären Proteinmuster, die nicht auf eine verstärkte Freigabe der Lipoproteine zurückzuführen waren, konnten nicht identifiziert werden. Die experimentell verifizierten Lipoproteine sind in der Tabelle 3.4 zusammengestellt.

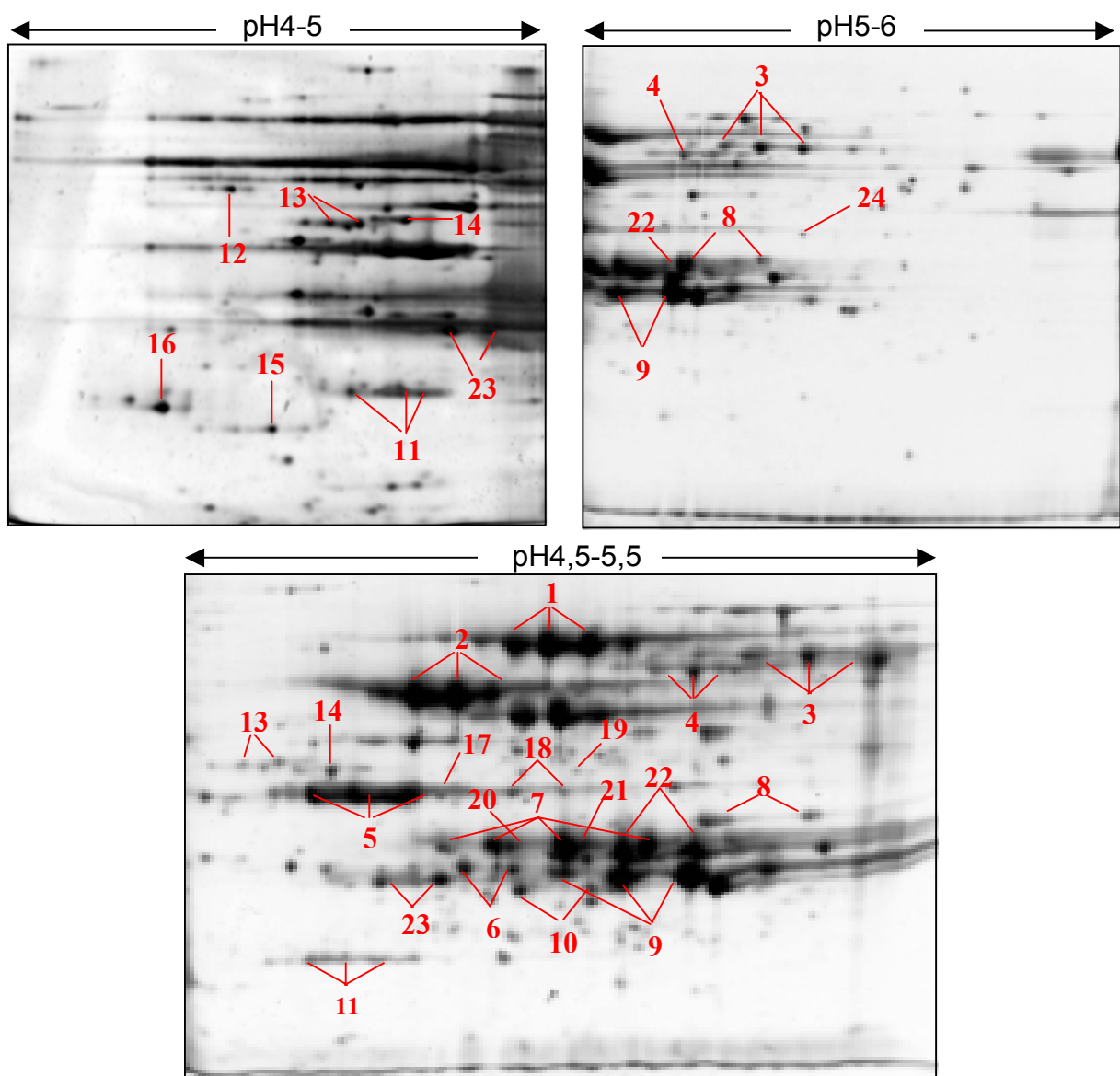


Abbildung 3. 16 : Hochauflösende Auftrennung der extrazellulären Proteine des *Δgt Liga157*-Stammes mit Hilfe von Zoomgelen. Die mit Pfeilen markierten Proteinspots waren in dem extrazellulären Proteom des wt Liga157-Stammes entweder gar nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorzufinden. Die mit Hilfe der MS-Analyse identifizierten Proteine sind in der Tabelle 3.4 zusammengestellt.

Zur Absicherung der Daten wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt, bei denen das extrazelluläre Proteom der drei Stämme (*wt* Liga157, Δ *lgt* Liga157, komplementierte Mutante) jeweils in den drei unterschiedlichen pH-Bereichen (pH4-5, pH4,5-5,5, pH5-6) aufgetrennt und analysiert wurde. Auch bei dem Vergleich der Zoomgele konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem extrazellulären Proteom des *wt* LiGA 157-Stammes und der komplementierten Mutante detektiert werden.

Tabelle 3.4: Experimentell bestätigte Lipoproteine von *L. monocytogenes*. Aufgelistet sind die in Abbildung 3.13 und Abbildung 3.16 markierten extrazellulären Proteine des Δ *lgt* Liga157-Stammes. In der vierten Spalte ist die Konsensussequenz der Lipobox angegeben. n* = Position des Cysteins im Prälipoprotein.

Spot	Gen	Funktion	Lipobox				
			-3	-2	-1	C _{n*}	+2
1	lmo2196	Oligopeptid-Bindungsprotein OppA	L	V	A	C ₂₃	G
2	lmo0135	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	L	T	A	C ₂₀	G
3	lmo0152	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	L	T	A	C ₂₂	G
4	lmo2569	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	L	T	A	C ₂₃	Q
5	<i>tscA</i>	T-Zell stimulierendes Antigen, TcsA	L	G	A	C ₂₃	G
6	lmo1073	Homolog zu Substratbindungsprotein (Eisen-ABC-Transporter)	L	T	A	C ₁₉	G
7	lmo2637	Homolog zu Sexpheromon cAD1	L	V	G	C ₂₃	G
8	lmo1068	Unbekannt	L	G	A	C ₂₀	G
9	lmo2219	Homolog zu Posttranslokationschaperon PrsA von <i>B. subtilis</i>	L	A	A	C ₂₁	G
10	lmo2417	Homolog zu Substratbindungsprotein (Zucker-ABC-Transporter)	L	T	A	C ₂₁	G
11	lmo2331	unbekannt, Ähnlichkeit zu gp32_Bacteriophage A118	L	T	G	C ₂₂	G
12	lmo0181	Homolog zu Substratbindungsprotein (ABC-Transporter)	L	S	A	C ₂₁	G
13	lmo2079	Unbekannt	I	S	A	C ₂₁	G
14	lmo0945	unbekannt, Ähnlichkeit zu Kompetenzproteinen	L	S	G	C ₁₉	S
15	lmo0791	Unbekannt	L	S	A	C ₂₁	G
16	lmo0047	Unbekannt	L	S	A	C ₂₁	S
17	lmo1671	Homolog zu Substratbindungsprotein (Metall-ABC-Transporter) und Adhäsionsproteinen	L	T	G	C ₂₂	S
18	lmo2636	Homolog zu Thiaminbiosynthese-Lipoprotein ApbE	V	S	A	C ₂₀	G
19	lmo1757	Unbekannt	L	S	G	C ₁₈	A
20	lmo2431	Homolog zu Substratbindungsprotein (Ferrichrom-ABC-Transporter)	L	A	S	C ₂₀	G
21	lmo0541	Homolog zu Substratbindungsprotein (Eisen-ABC-Transporter)	L	T	A	C ₂₃	G
22	lmo1847	Homolog zu Substratbindungsprotein (Metallionen-ABC-Transporter)	L	A	G	C ₁₉	S
23	lmo1738	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glutamin-ABC-Transporter)	L	G	A	C ₂₀	S
24	lmo2416	Unbekannt	L	S	G	C ₂₁	S

Obwohl die 24 identifizierten Lipoproteine in relativ großen Mengen exprimiert wurden und somit wahrscheinlich für wichtige Funktionen in der Bakterienzelle verantwortlich sind, befinden sich insgesamt sechs Proteine unter den 24 Lipoproteinen, deren Funktion bislang noch nicht analysiert worden ist (Lmo1068, Lmo2079, Lmo0791, Lmo0047, Lmo1757, Lmo2416). Dieses Ergebnis verdeutlicht, wie wenig bislang über die Rolle der Lipoproteine bei den grampositiven Bakterien bekannt ist.

3.2.4. Analyse der Oligopeptid-Bindungsproteine von *L. monocytogenes*

Bei der Hälfte der experimentell verifizierten Proteine handelt es sich um Substratbindungskomponenten verschiedener ABC-Importsysteme. Unter diesen 12 Proteinen befinden sich zum einen auffällig viele Substratbindungskomponenten, die eine Substratspezifität für verschiedene Eisenverbindungen aufweisen (Lmo1073, Lmo0541, Lmo2431), zum anderen konnten interessanterweise alle Oligopeptid-Bindungsproteine (OppA, Lmo0135, Lmo2569, Lmo0152), die für *L. monocytogenes* vorhergesagt wurden, in dem extrazellulärem Proteom der Δlgt -Mutante identifiziert werden. Wie in der Abbildung 3.17 zu sehen ist, wurden die vier Proteine in verhältnismäßig großen Mengen sekretiert. OppA und Lmo0135 stellen sogar die zwei dominantesten Lipoproteine des Kulturüberstandes der Deletionsmutante dar.

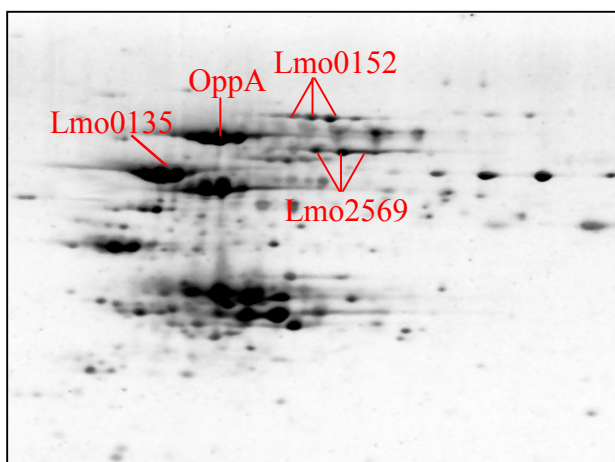


Abbildung 3. 17 : Detektion der vier Oligopeptid-Bindungsproteine in dem extrazellulären Proteom der *lgt*-Deletionsmutante.

Ein Sequenzvergleich zeigte, dass die vier Oligopeptid-Bindungsproteine nicht nur ein ähnliches Molekulargewicht und einen ähnlichen isoelektrischen Punkt besitzen, sondern dass sie ebenfalls eine sehr hohe Sequenzübereinstimmung aufweisen. Während neben der Lipobox noch weitere hochkonservierte Bereiche vorlagen, gehörte die vorhergesagte substratbindende Domäne der Proteine zu den Bereichen, bei denen eine höhere Varianz zu

vermerken ist (Abb. 3.18). So weist z.B. die substratbindende Domäne von Lmo2569 abweichend zu denen der anderen drei Proteine eine hohe Homologie zu der substratbindenden Domäne von dipeptidspezifischen ABC-Transportkomponenten auf.

	1	Lipobox	6
Lmo2196	MKKS	KLFLTLGLTLLLS	LVLYACGGGSDSKSDKKGSDSGKASGEQVLNLTESALIPSADSTKAD
Lmo2569	MHK	TARKM	VYALSLLCLLVLTACQSGDKGESEKVTSDKKA----KYVNMETSGIPNASPTLADN
Lmo0152	MHFL	KKTLPI-FAIL	TVLLLTACGNDNEKSTTKTSPDK-----IKFLETSELLTLNTAEED
Lmo0135	MKKF	LLVAVISVFAL	LVLTACGGSGASSDKANGSGKAKDGGSLIGVTGDPFV--INPNYASD
Consensus	n...	kkf\$.va...l..LvLtACgg...ss..k.gsdk.k..g...i..te..e....npt.a.#	
	6	substratbindende Domäne	130
Lmo2196	QVGL	MVYNQ	TNEGLYALDKDGI
Lmo2569	SVS	FRVINQ	IFEGLYRLDKNGK
Lmo0152	RAS	FTAQ	QNVFEGLYTLDQKDNFVPGVADGM
Lmo0135	FVT	LTITQ	QAVYAPLF-HEVDGKPA
Consensus	.v..lt..q#qv.egL%.l#.	dgkpala.a...p.isdd..tyt..Klk..a..Hs#G.pvTA#D..v%.	
Lmo2196	WRR	AYDP	NTAATYS-YLFD
Lmo2569	MKK	YVDP	KTAARYGPQMEI
Lmo0152	WRR	AYDP	KTAPGYSALFKDS
Lmo0135	VNS	ILDTK-----	QNSPNRGNFVFD
Consensus	u....vDp	kt..y.....kN...#i..g.....lg!.AvDdtTl..tL..p.p.f..l.t..	
Lmo2196	ITFP	-LNEK	FVTEKGEKYAQNSDNMLFN
Lmo2569	ITFP	-QNQA	FVEKQDQRYGTSK
Lmo0152	ITFP	-KESY	VKKQDQYGTSAHTLYNGPFV
Lmo0135	ITFP	IPKH	IFEGVENIEKSDKNK
Consensus	ITFP...	k...%v...g..y..ks.n.i.nGP%k...#u.g..t...u.y.kn..ywdk.kvkl.k!.v	
Lmo2196	QVY	QDSGTG-LNL	YNTDKYDRTVLSADYAAQ
Lmo2569	TVY	KDTNAA-LNL	YNTNKLDRVELDGEFVKQY
Lmo0152	QVA	KDINAG-VNL	YNTNEADRVPLSGDFAKQY
Lmo0135	RIT	KDQNAANLALQ	NGEINLKSIPSDRNKVEKASAVNIITYPENRLSYATFNE
Consensus	..!..kD.naa.lnLy	Nt#...dr..l..#...kq.K..k.#...t....r.sY..fN#...g..t.lan	
Lmo2196	KNIR	KAI	LAIDKQSYTDTVLKNGSKPAN
Lmo2569	LNLR	RGLAM	AIDKTGMVNTLLANGSKALNGDVP
Lmo0152	NSLR	HALNL	AVDKKQLTDRILGDSFPANGLL
Lmo0135	KEL	RQALSYALD	REEIIDARYGSEYAK----
Consensus	k.lR.al...A.Dk....#...	lg.gs.a.n...P.....p.tk.d%.t#.g..l..#...eA.k.u	
Lmo2196	KAGL	KELG	VNEITVEFTSDTENARKSSEFI
Lmo2569	KQGL	KEIG	SELTLTSGDTSLQRKQTEFI
Lmo0152	KQAQ	KELG	TDKVTIELLGDQETTKTIFAYL
Lmo0135	KESG	FOTS-QKL	TYYYL-NNSKSQESIALYLQQQYKEIGVTLDLKPTDPNALSNITLDRKNADYS
Consensus	K...k#..g..klTv...l..#...	q...i...%lq.Q..enl.glt.K.k#.....s..qld..n..%.	
Lmo2196	DFSH	SGHGPDYQDP	STFLDLFVTDGAQNRMSYSNKDYD
Lmo2569	ELL	LGGHGDYQD	PLTYLNLFLTNSPGNHTGFS
Lmo0152	DLS	LAAHMPDFK	DPWYSSFLSDYFNHMSYN
Lmo0135	SIAL	NGYIMG-N	DPDAYKSLYLS
Consensus	...\$.gu...d..DP.t.%sL%	ls#.p.N...%.nkdyD.l....kg...add.eRu#e...eq.l	
Lmo2196	LTOD	VATIQPLYQR	STAYLQKDYIKNLQKNPFGPDYTYKETYLT
Lmo2569	LKDN	AVLIPLYQ	GGRAYLQKSNLKNYTTYPIGSE-NYK
Lmo0152	LDDA	RAILPLYQ	HQTAVLQRTDITGVQKHAFGSPYSYK
Lmo0135	IADD	AVIYPISYD	NAVLA
Consensus	I.D#avi.Plyq...	a.lq.s...g.....gp....%k....k.....	

Abbildung 3. 18 : Sequenzvergleich der vier Oligopeptid-Bindungsproteine von *L. monocytogenes*. Der Sequenzvergleich wurde mit dem im Internet frei zugänglichen MultAlin-Programm (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) durchgeführt.

Eine Analyse der Genloci zeigte, dass nur bei einem der vier Substratbindungsproteine Hinweise auf ein korrespondierendes ABC-Transportsystem zu finden sind (Abbildung 3.19). Ausschließlich bei dem OppA-kodierenden Gen konnte eine Organisation mit den übrigen ABC-Transportkomponenten in einem putativen Operon ermittelt werden. Strangaufwärts von lmo0135 befinden sich zwar DNA-Sequenzen, die für zwei Permeaseproteine kodieren könnten, jedoch fehlen auf diesem möglichen Operon die proteinkodierenden DNA-Sequenzen für die dazugehörigen ATP-Bindungsproteine. Während bei den Analysen der aufgereinigten Membranfraktion (s. Kapitel 3.1.) bereits mehrere Bestandteile des OppBCDF-Transportsystems identifiziert werden konnten (OppC, OppD, OppF, Tab. 8.1, Anhang), konnte zudem kein Nachweis der beiden Permeasen Lmo0136 und Lmo0137 erbracht werden (Abb. 3.19). Auch an anderen Stellen auf dem Chromosom von *L. monocytogenes* konnten keine Hinweise auf ein weiteres oligopeptidspezifisches Transportsystem gefunden werden.

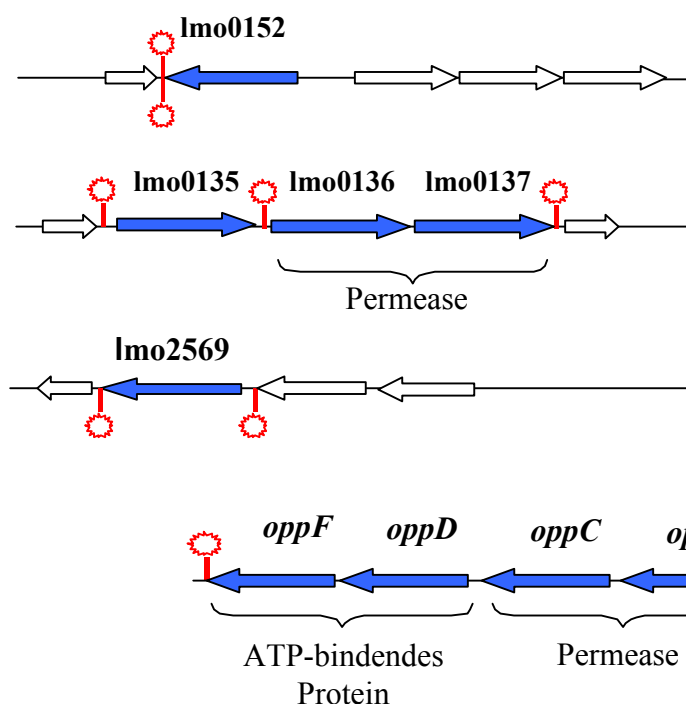


Abbildung 3.1 : Schematische Darstellung der vier Genloci lmo0152, lmo0135, lmo2569, oppA. Nur bei der OppA-kodierenden Gensequenz sind Hinweise auf ein korrespondierendes ABC-Transportsystem zu finden.

↑ = Terminator nach den Angaben der Listeria-Genomdatenbank (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>)
 ⌞ = Terminator-ähnliche Sequenz nach den Angaben von Borezee et al. (2000)

Borezee et al. (2000) konnten anhand von Transkriptionsanalysen zeigen, dass zum Teil ein polycistronisches *oppABCDF*-Transkript gebildet wird. Allerdings konnten sie ebenfalls analysieren, dass kurz hinter dem Stopcodon von *oppA* eine terminatorähnliche Sequenz angeordnet ist, die vorwiegend zur Bildung eines singulären *oppA*-Transkriptes führt.

Um zu untersuchen, ob eventuell nicht nur OppA mit dem OppBCDF-Transportsystem interagiert, sondern ebenfalls die anderen drei Oligopeptid-Bindungsproteine einen Komplex mit dem Membrantransporter eingehen, wurde eine Blau-Native/SDS-Gelelektrophorese (BN/SDS-PAGE) durchgeführt. Die Blau-Native-Gelelektrophorese wurde ursprünglich von Schägger und von Jagow (1991) zur Analyse mitochondrialer Membranproteinkomplexe entwickelt. Adaptionen für die Untersuchung prokaryotischer Proteinkomplexe wurden bereits von Heuberger et al. (2002) vorgenommen. Die Charakterisierung bakterieller Proteinkomplexe mittels BN/SDS-PAGE stellt aber noch kein allgemein etabliertes Verfahren dar. Bei der BN/SDS-PAGE werden die Proteinkomplexe in der ersten Dimension gemäß ihres Molekulargewichtes unter nativen Bedingungen aufgetrennt. Auf diese Weise wird die native Konformation der Proteine und somit die Struktur von Proteinkomplexen während der Gelelektrophorese erhalten. In der zweiten Dimension erfolgt eine SDS-PAGE, bei der die Komplexstrukturen durch die denaturierenden Bedingungen aufgehoben werden.

Insgesamt wurden 38 Proteinspots aus dem BN/SDS-Gel mit Hilfe der MS-Analyse identifiziert. Neben dem Oligopeptidtransportsystem konnten Hinweise auf vier weitere Proteinkomplexe gefunden werden. Dazu gehörte unter anderen der ATP-Synthase-Komplex und die Pyruvat-Dehydrogenase, deren Komplexstrukturen bereits bei anderen Organismen ausführlich untersucht worden sind (Madigan et al., 2001). Durch die Analyse bereits bekannter Proteinkomplexe wurde deutlich, dass dieses System generell für die Analyse bakterieller Proteinkomplexe geeignet ist. Eine Auflistung der identifizierten Proteine aus dem BN/ SDS-Gel und die Hinweise auf die vier weiteren Proteinkomplexe sind im Anhang (Tab. 8.3, Abb.8.1 und 8.2, Anhang) zu finden.

Mit Hilfe der BN/SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass das OppBCDF-Transportsystem einen der dominantesten Proteinkomplexe der listeriellen Zellmembran darstellt. So konnten gleich mehrere Bestandteile des OppBCDF-Transportsystem im Komplex nachgewiesen werden. Sowohl die zwei ATP-Bindungsproteine (OppD, OppF) als auch eine der beiden Permeasen (OppB) wurden auf derselben vertikalen Spur in dem BN/SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 3.20). Hinweise auf die Interaktion eines der vier Oligopeptid-Bindungsproteine mit dem Komplex konnten jedoch nicht erbracht werden. Weder OppA noch eines der anderen drei Lipoproteine befanden sich unter den identifizierten Proteinen.

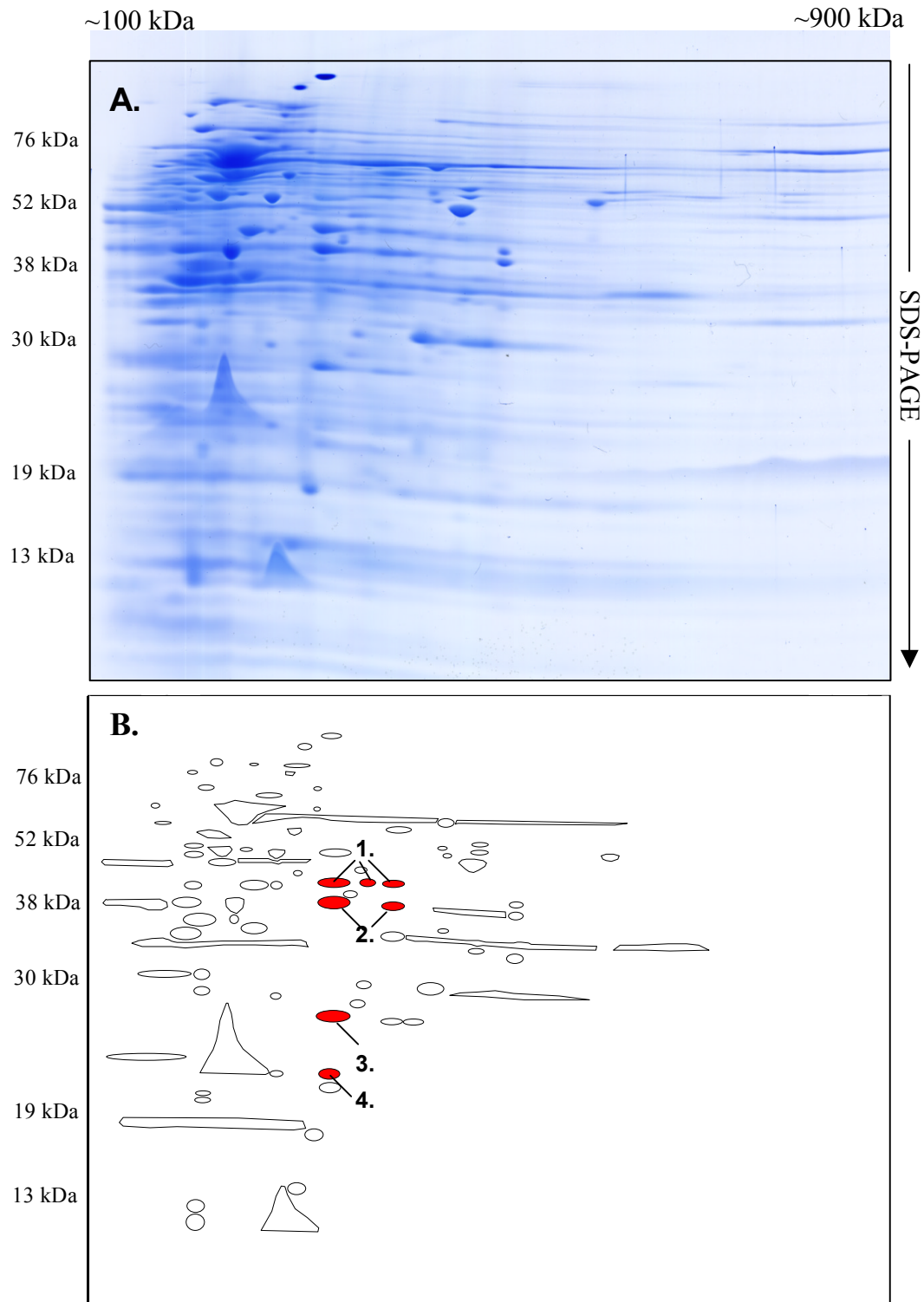


Abbildung 3.20 : Zweidimensionale Auftrennung von listeriellen Proteinkomplexen mittels BN/SDS-PAGE. Aus unaufgereinigten Zellmembranen wurden Proteinkomplexe isoliert und unter nativen Bedingungen über die BN/SDS-PAGE aufgetrennt. In der zweiten Dimension erfolgte eine SDS-PAGE, bei der die Komplexe in einer vertikalen Linie im Gel in ihre einzelnen Bestandteile aufgetrennt wurden. **A.** Coomassie gefärbte BN/ SDS-Gel. In der schematischen Darstellung (**B**) des BN/SDS-Gel korreliert die Größe der Ovale mit der räumlichen Ausdehnung der Proteine und nicht mit der Intensität der Färbung. Die rotgefärbten Ovale stellen die mittels MS-Analyse identifizierten Bestandteile des OppBCDF-ABC-Transportsystems dar: **1.OppF, 2. OppD, 3. OppB, 4. Fragment von OppF.**

3.2.5. Einfluss der Lipoproteinmodifizierung auf den Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

Um den Einfluss der Lipoproteine auf den Infektionszyklus von *L. monocytogenes* zu analysieren, wurden Infektionsanalysen mit dem Wildtypstamm und der Δlgt -Mutante im Vergleich durchgeführt. Dazu wurden eukaryotische Zellen mit Listerien infiziert und nach einer halben Stunde Infektion das Antibiotikum Gentamycin hinzugefügt. Gentamycin diente zur Abtötung extrazellulärer Bakterien, um somit mögliche Neuinfektionen während der Kultivierung der infizierten Zellen zu vermeiden. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (1,3,5 und 7 Stunden) wurde schließlich die Anzahl der intrazellulär vorkommenden Bakterien bestimmt. Als Wirtszellen wurde zum einen die Mausfibroblastenzelllinie 3T3, die über den Internalin B-Weg infiziert wird, und zum anderen die humane Darmepithelzelllinie CACO-2 verwendet, bei der die Invasion über die spezifische Bindung von Internalin A mit e-Cadherin erfolgt.

Wie in dem Box-Whisker-Plot zu sehen ist und in einem t-Test („students test“) bestätigt wurde, konnten nach einer Stunde keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl der intrazellulären Bakterien des Wildtypstammes und der Deletionsmutante festgestellt werden. Während bei der Infektion der 3T3-Zellen ein P-Wert von 0,665 ermittelt wurde, wurde bei den CACO-2-Zellen ein P-Wert von 0,415 bestimmt. Beide Werte lagen weit über dem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$. Dieses deutet darauf hin, dass die Deletionsmutante unabhängig von dem Invasionsweg (Internalin A /Internalin B) genauso invasiv wie der Wildtypstamm ist. Zur statistischen Absicherung der Daten wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt (Abb.3.21).

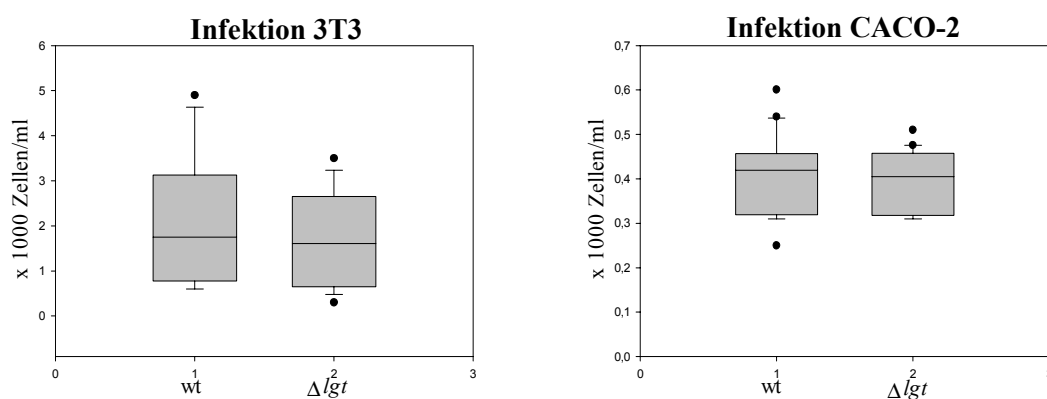


Abbildung 3.21: Anzahl der intrazellulären Bakterien nach einer Stunde im Box-Whisker-Plot. Der Box-Whisker-Plot zeigt eine Normalverteilung der Daten.

Zu den übrigen drei Zeitpunkten konnten deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm und der Δlgt -Mutante detektiert werden. So wies die Δlgt -Mutante bei der Infektion der 3T3-Zelllinie ein um ca. die Hälfte vermindertes Wachstum auf, während bei den CACO-2-Zellen die intrazelluläre Vermehrung um ca. ein Drittel reduziert war. Obwohl die drei Experimente pro Zelllinie eine hohe Varianz aufwiesen, konnten die Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm und der Deletionsmutante in allen Experimenten bestätigt werden (Abb. 3.22).

Die Lipidmodifizierung der Prälipoproteine scheint somit keinen Einfluss auf die Invasion des Erregers zu besitzen, spielt aber bei der intrazellulären Vermehrung der Bakterien eine wichtige Rolle.

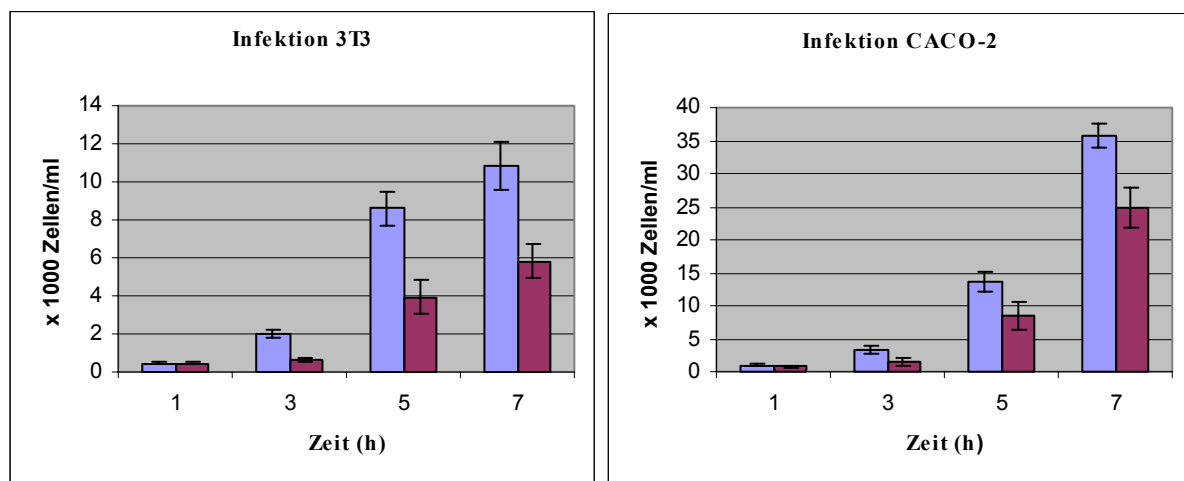


Abbildung. 3. 22 : Intrazelluläres Wachstum des Wildtypstammes und der Δlgt -Mutante von *L. monocytogenes*. Die Mausfibroblastenzelllinie 3T3 (A.) und die humane Darmepithelzelllinie CACO-2 (B.) wurden mit 6 Bakterien pro Zelle mit dem Wildtypstamm (■) und der Δlgt -Mutante (■) infiziert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 3, 5 und 7 Stunden) wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien mittels Ausplattierungsexperimenten bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte und Standardabweichungen jeweils eines repräsentativen Versuchs von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Um zu untersuchen, ob es sichtbar auffällige Unterschiede im intrazellulären Wachstum der Deletionsmutante gibt, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierbei wurde sowohl das Aktinzytoskelett als auch die Oberfläche der Listerien mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern bzw. Phalloidin angefärbt. Ein Vergleich der Aufnahmen nach 1, 2 und 3 Stunden zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen dem Wildtypstamm und der Δlgt -Mutante. In beiden Fällen konnten nach einer Stunde vorwiegend Bakterien angefärbt werden, die sich gerade am Beginn des Teilungsstadiums befanden. Mit zunehmender Zeit wurden schließlich immer mehr Aktinschweife von den Listerien ausgebildet (Abb. 3.23).

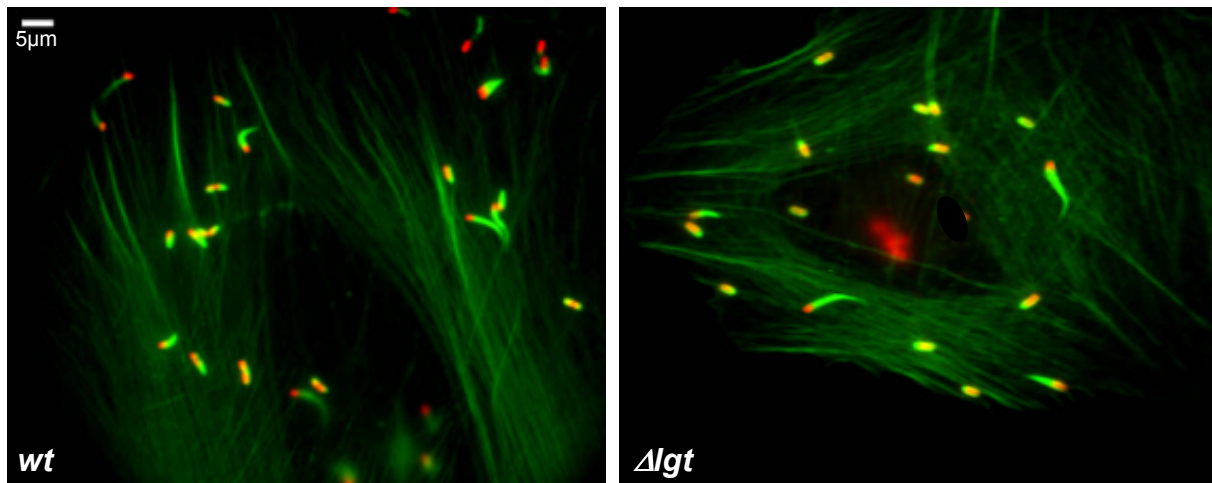


Abbildung 3. 23 : Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Wildtypstammes (*wt*) und der *Δlgt*-Mutante. Die Mausfibroblastenzelllinie 3T3 wurde mit 150 Bakterien pro Zelle eine halbe Stunde lang infiziert und nach 3 Stunden fixiert. Filamentöses Aktin (grün) wurde mit Phalloidin und die Listerien (rot) mit Hilfe von Antikörpern angefärbt.

3.2.6. Herstellung und vergleichende Analyse unterschiedlich PrfA-exprimierender *Δlgt*-Stämme

Um Lipoproteine ausfindig zu machen, deren Expression PrfA-abhängig und somit wahrscheinlich intrazellulär induziert wird, sollten im weiteren Verlauf der Arbeit PrfA-regulierte Lipoproteine identifiziert werden. Wie bereits im Kapitel 3.1.3. beschrieben, bietet die Suche nach PrfA-regulierten Proteinen eine vielversprechende Möglichkeit, um weitere an der Virulenz des intrazellulären Erregers beteiligte Proteine und somit auch Kandidaten, die für die unterschiedliche intrazelluläre Vermehrung des Wildtypstammes und der *Δlgt*-Mutante verantwortlich sein könnten (s. Kapitel 3.2.4.), zu identifizieren.

Zur Erleichterung der Untersuchungen wurde zunächst eine *Δlgt/ΔprfA*-Doppeldeletionsmutante und ein konstitutiv PrfA-überexprimierender *Δlgt*-Stamm entwickelt. Für die Herstellung der *Δlgt/ΔprfA*-Doppeldeletionsmutante wurde der im Kapitel 3.2.3.1. vervielfältigte pAUL-A-Vektor mit dem Ligationsinsert für die *lgt*-Deletion anstatt in den EGD Wildtypstamm in den *ΔprfA*-Stamm von *L. monocytogenes* transformiert. Die Integration und Exzision des rekombinanten Plasmids sowie die Kontrolle der Deletion erfolgte wie unter 3.2.3.1. beschrieben.

Zur Herstellung des konstitutiv PrfA-überexprimierenden *Δlgt*-Stammes wurde der Liga160-Vektor (mit *prfA7973*-Insert, Abb. 2.2) in die *Δlgt*-Mutante transformiert.

Um bei den späteren Proteomanalysen ausschließen zu können, dass Unterschiede zwischen den Stämmen auf die Anwesenheit des Plasmides zurückzuführen sind, wurde der Liga155-Vektor sowohl in den $\Delta lgt/\Delta prfA$ -Stamm als auch in den Δlgt -Stamm transformiert. Der Liga155-Vektor ist bis auf das fehlende *prfA7973*-Gen identisch mit dem Liga160-Vektor. Die Kontrolle der drei Transformationsstämmen erfolgte in der PCR mit Hilfe der Oligonukleotide 3Primpl1 und 5Primpl2, wobei ein 368bp großes Fragment amplifiziert wurde.

Da PrfA unter Minimal-Medium-Bedingungen verstärkt exprimiert wird (Bohne et al., 1994) und daher die folgenden Analysen alle in Minimal-Medium durchgeführt wurden, musste zunächst die Vitalität und Vermehrungsfähigkeit der drei Transformationsstämmen in diesem Medium ermittelt werden. Ein Vergleich der Wachstumskurven offenbarte einen Wachstumsvorteil des $\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155-Stammes gegenüber den anderen beiden Stämmen. Während die Wachstumskurve des Δlgt Liga155-Stammes einen ähnlichen Verlauf wie die des $\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155-Stammes aufwies, war bei dem PrfA-überexprimierenden Δlgt -Stamm ein stark verzögertes Wachstum erkennbar (Abb.3.24).

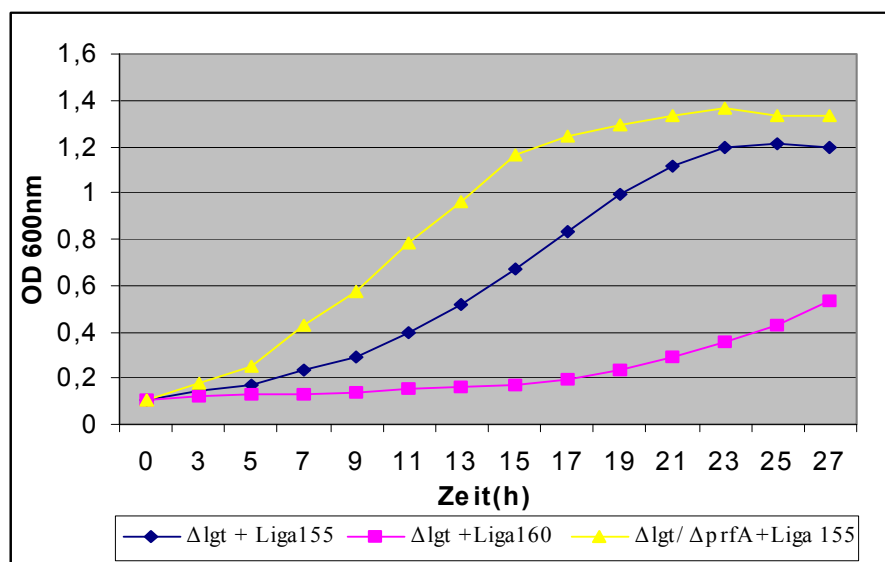


Abbildung 3.24 : Wachstumskurven des $\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155-Stammes, des Δlgt Liga155-Stammes und des PrfA-überexprimierenden Δlgt -Stammes von *L. monocytogenes*. Die Kultivierung der Bakterien wurde in Minimal-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator durchgeführt.

Die Identifizierung der PrfA-abhängigen Lipoproteine erfolgte durch den Vergleich des extrazellulären Proteoms der drei Transformationsstämme. Dazu wurde der $\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155-Stamm und der Δlgt Liga155-Stamm bis zum Erreichen der stationären Phase in dem Minimal-Medium angezogen. Der Überstand des konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δlgt -Stammes wurde parallel mit dem Δlgt Liga155-Stamm aufbereitet. Nach der zweidimensionalen Auftrennung der extrazellulären Proteine und der Visualisierung der Proteinspots mittels Fluoreszenzfärbung folgte die Auswertung der Gele mit Hilfe der Software Proteomweaver 2.0 (Definiens). Die Normalisierung der Proteinspots erfolgte auf der Basis des Gesamtpotvolumens der Proteinspots, die gemeinsam in dem Proteinmuster aller drei Stämme detektiert werden konnten.

Ein Vergleich der Gelsätze von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten offenbarte 6 Proteinspots, die in allen Experimenten sowohl bei dem Δlgt Liga155-Stamm als auch bei dem konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δlgt -Stamm exklusiv oder hochreguliert vorzufinden waren. Hierbei war jeweils eine deutliche Steigerung der Spotvolumina von dem Δlgt Liga155-Stamm bis hin zu dem konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δlgt -Stamm zu vermerken. Diese 6 Proteinspots korrespondierten zu drei der bereits bekannten PrfA-abhängigen Proteine (InlC, InlA, ActA) und den zwei Proteinen Lmo0366 und Lmo2219. Während Lmo2219 bereits im Kapitel 3.2.3.2. experimentell als Lipoprotein nachgewiesen werden konnte, handelt es sich bei Lmo0366 ebenfalls um ein putatives Lipoprotein, das jedoch noch nicht als Lipoprotein verifiziert werden konnte.

Ein Proteinspot war deutlich in die entgegengesetzte Richtung reguliert. Dieser Spot, der auf derselben Molekulargewichtshöhe mit dem Oligopeptid-Bindungsprotein OppA lief, konnte in großen Mengen in dem extrazellulären Proteom des $\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155-Stammes detektiert werden, während er bei dem Proteinmuster des konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δlgt -Stammes meist nur sehr schwach erkennbar war. Die MS-Analyse dieses Spots ergab, dass es sich hierbei ebenfalls um das Oligopeptid-Bindungsprotein OppA handelt. Aufgrund der pI-Verschiebung (theoretischer pI=5,07) ist anzunehmen, dass diese „zweite Form“ von OppA (OppA 2) auf eine posttranslationale Modifizierung des Proteins zurückzuführen ist (Abb.3.25).

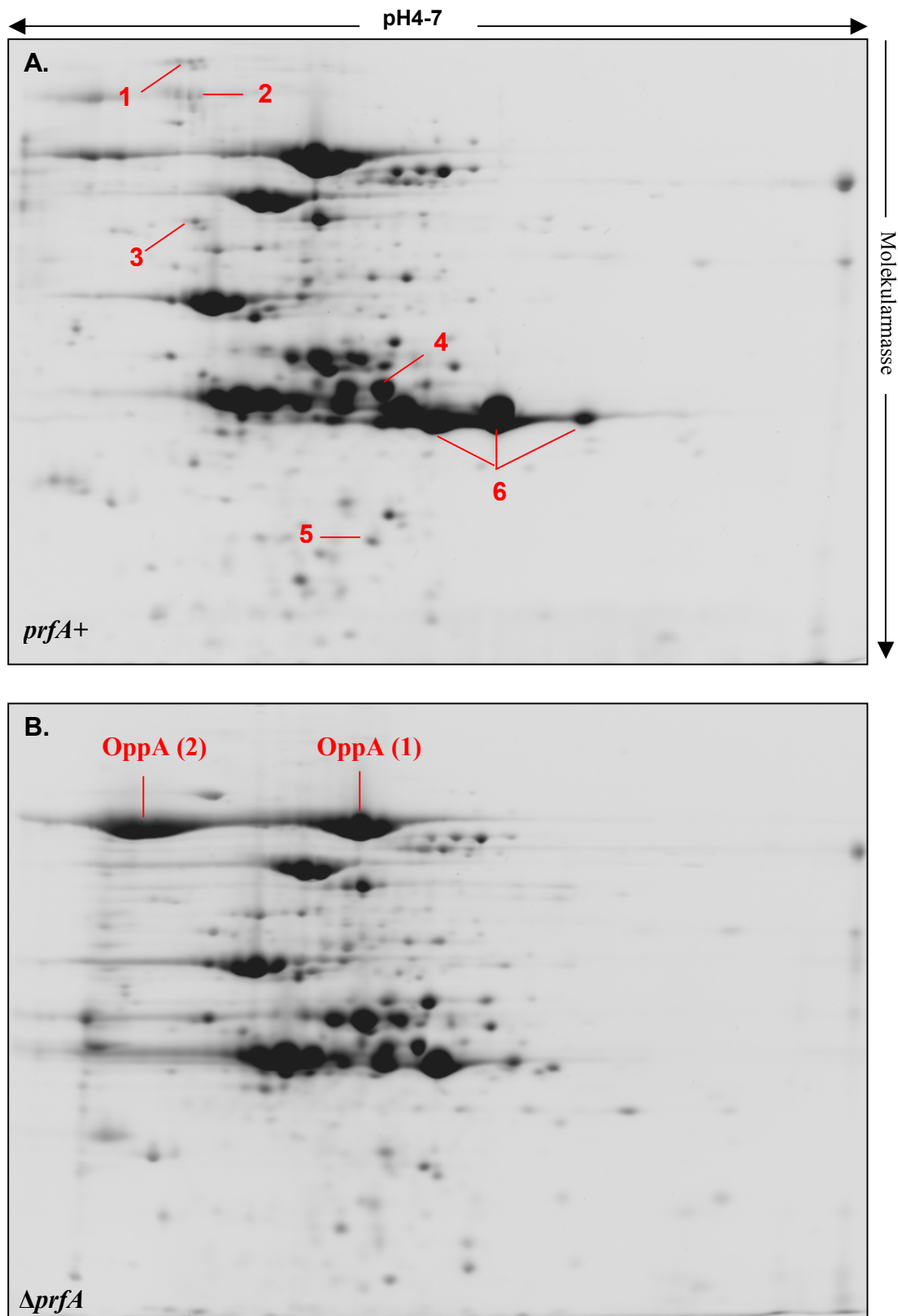


Abbildung 3.25 : Unterschiede in dem extrazellulären Proteom des konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δgt -Stammes (A.) und des $\Delta gt/\Delta prfA$ Liga155-Stammes (B.). *L. monocytogenes* wurde in Minimal-Medium angezogen und die im Kulturüberstand befindlichen Proteine über eine 2D-PAGE aufgetrennt. Nach Visualisierung der Proteinspots mit Hilfe von RuPBS erfolgte ein Vergleich der Proteinmuster mit Hilfe der Software Proteomweaver 2.0 (Definiens). Die Proteine, die in drei unabhängigen Experimenten deutlich als reguliert bestätigt werden konnten, wurden mit roten Pfeilen markiert und mit Hilfe der MS-Analyse identifiziert. Die identifizierten Proteine sind in der Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5 : PrfA-regulierte Proteine aus dem Kulturüberstand des $\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155-Stammes, des Δlgt Liga155-Stammes und des konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δlgt -Stammes. Die Spotnummerierung entspricht der Kennzeichnung in der Abbildung 3.2.5. Die Vorhersage einer möglichen PrfA-Box richtet sich nach den Angaben von Glaser et al. (2001). In der Spalte „Expression“ sind die vorliegenden Mengen der Proteine in dem extrazellulären Proteom des $\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155-Stammes, des Δlgt Liga155-Stammes und des konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δlgt -Stammes graphisch dargestellt: (-): kein Protein im Gel sichtbar, (+): schwach exprimiertes Protein, (++): mittlere Proteinexpression, (+++): starke Proteinexpression, (++++): sehr starke Proteinexpression.

Spot	Gen	Funktion	PrfA-Box	Expression		
				$\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155	Δlgt Liga155	Δlgt Liga160
1/5	<i>actA</i>	Aktin-Nukleationsfaktor	ja	-	+	++
2	<i>inlA</i>	InternalinA	ja	-	+	++
3	lmo0366	Unbekannt	nein	-	+	++
4	lmo2219	Posttranslokationschaperon, PrsA	ja	+	++	+++
6	<i>inlC</i>	Internalin C	ja	-	+++	++++
OppA (2)	<i>oppA</i>	Oligopeptid-Bindungsprotein OppA	nein	++++	++	+

3.2.7. Analyse der Lipoproteine mit Hilfe von Antikörpern

Von den 68 putativen Lipoproteinen wurden zehn ausgewählt, gegen die polyklonale Antikörper entwickelt wurden. Durch die Antikörperherstellung sollte die Analysetechnik einiger für die Virulenz von *L. monocytogenes* möglicherweise interessanter Lipoproteine verfeinert werden. Das Auswahlkriterium richtete sich nach dem Vorhandensein einer putativen PrfA-Box, dem Fehlen eines entsprechenden Orthologs in der apathogenen Spezies *L. innocua* oder einer interessanten Funktion, wie bei Lmo1800, das analog zu der bei verschiedenen *Yersinia*-Spezies an der Virulenz beteiligten Tyrosinphosphatase YopH ist (Finlay und Cossart, 1997). Die ausgewählten Lipoproteine sind in der Tabelle 3.6 zusammengestellt.

Innerhalb des Rahmens dieser Arbeit war es möglich, Antikörper gegen fünf der zehn ausgewählten Lipoproteine aufzureinigen und deren Spezifität für die jeweiligen Proteine nachzuweisen (Lmo2417, Lmo1068, Lmo0355, Lmo1800, Lmo2595). In der Immunfärbung von eindimensional aufgetrennten Gesamtproteinextrakten konnten auf der entsprechenden Molekulargewichtshöhe der fünf Proteine jeweils eine spezifische Bande detektiert werden.

Tabelle 3.6 : Auswahl der Lipoproteine, gegen die Antikörper entwickelt wurden.

Gen	Auswahlkriterium	Funktion
lmo0255	kein Ortholog in der apathogenen Spezies <i>L. innocua</i> vorhanden	Unbekannt
lmo0355	wurde bei den Analysen unter 3.1.3. als putativ PrfA-abhängig identifiziert.	Homolog zu Flavocytochrom C Fumarat-reduktasekette A
lmo0460	kein Ortholog in der apathogenen Spezies <i>L. innocua</i> vorhanden	Unbekannt
lmo1068	Ortholog in der apathogenen Spezies <i>L. innocua</i> vorhanden, jedoch ohne Lipobox	Unbekannt
lmo1757	Putative PrfA-Box	Unbekannt
lmo1800	analog zu der Tyrosinphosphatase YopH ist (Finlay und Cossart, 1997).	Homolog zu Protein-Tyrosinphosphatase
lmo2417	im Operon mit putativer PrfA-Box organisiert	Homolog zu Substratbindungsprotein ABC-Transporter
lmo2125	Putative PrfA-Box	Homolog zu Substratbindungsprotein (Maltose/Maltodextrin- ABC-Transporter)
lmo2594	kein Ortholog in der apathogenen Spezies <i>L. innocua</i> vorhanden	Unbekannt
lmo2595	kein Ortholog in der apathogenen Spezies <i>L. innocua</i> vorhanden	Unbekannt

Für zwei der fünf Proteine (Lmo2417, Lmo1068) wurde bereits im Kapitel 3.2.3.3. ein experimenteller Nachweis für eine Lipidmodifizierung erbracht. Die anderen drei putativen Lipoproteine konnten hingegen nicht in dem Sekretom der Δlgt -Mutante identifiziert werden. Dieses könnte möglicherweise auf eine geringere Expression der korrespondierenden Gene zurückgeführt werden. Um auch diese Proteine experimentell als Lipoproteine nach-zuweisen, wurden die extrazellulären Proteine des Wildtypstammes und der Δlgt -Mutante über die 2D-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit Hilfe des sensitiven Antikörperrnachweises war es schließlich möglich, die Proteine in dem Sekretom der Δlgt -Mutante zu detektieren.

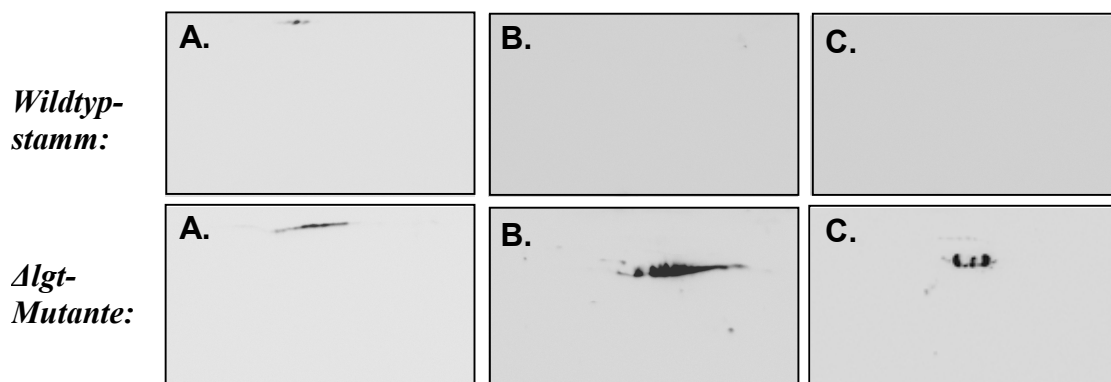


Abbildung 3.26 Westernblotanalyse extrazellulärer Proteine des Wildtypstammes und der Δlgt -Mutante. 150µg der im BHI-Kulturüberstand befindlichen Proteine wurden über eine 2D-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern gegen die Lipoproteine Lmo0355 (A.), Lmo1800 (B.) und Lmo2595 (C.)

Nur eines der drei Proteine (Lmo0355) konnte zusätzlich in dem Sekretom des Wildtypstammes entdeckt werden, jedoch lag es dort verglichen mit dem Sekretom der Δlgt -Mutante in deutlich reduzierten Mengen vor (Abb.3.26).

Die Antikörper wurden weiterhin eingesetzt, um eine mögliche PrfA-Abhängigkeit der fünf Lipoproteine nachzuweisen. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen des extrazellulären Proteoms des $\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155-Stammes, des Δlgt Liga155-Stammes und der konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δlgt -Mutante in einer Slot-Blot-Kammer aufgetragen und anschließend in der Immunfärbung analysiert. Mit Hilfe von jeweils drei unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von vier dieser Lipoproteine unabhängig von PrfA reguliert wird (Abb. 3.27). Dieses stimmt mit den Experimenten des Kapitels 3.5 überein. Auch hier konnte für die Lipoproteine Lmo1068 und Lmo2417 eine PrfA-unabhängige Genregulation beobachtet werden.

Bei dem Lipoprotein Lmo2595 deuten die Ergebnisse des Slot-Blots auf eine negative PrfA-Regulation des Proteins hin (Abb.3.27).

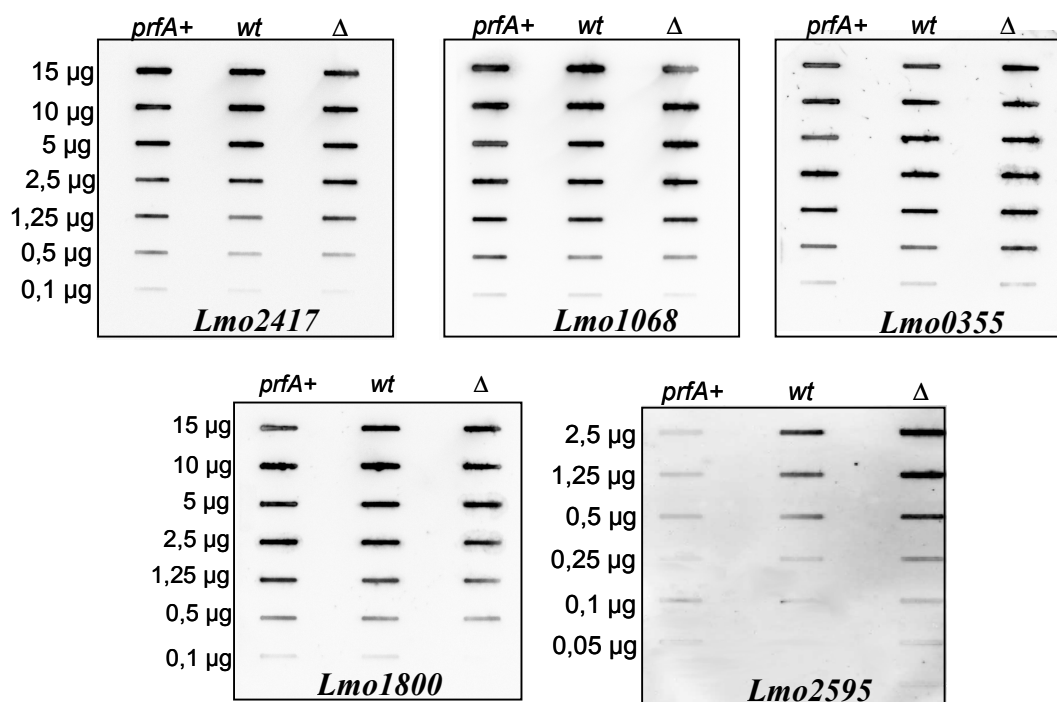


Abbildung 3. 27 : Vergleichende Expressionsanalyse des extrazellulären Proteoms der konstitutiv PrfA-überexprimierenden Δlgt Mutante (*prfA+*), des Δlgt Liga155-Stammes (*wt*) und des $\Delta lgt/\Delta prfA$ Liga155-Stammes (Δ) basierend auf Westernblotanalysen. Nach Anzucht der verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämme in Minimal-Medium wurden die im Kulturüberstand befindlichen Proteine mit Hilfe einer TCA/Acetonfällung extrahiert. Jeweils unterschiedliche Proteinkonzentrationen wurden in die Slot-Blot-Kammer aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern gegen die Lipoproteine Lmo2417, Lmo1068, Lmo0355, Lmo1800 und Lmo2595.

3.3. Hinweise auf die Prozessierung der Prälipoproteine durch die SPaseII

Um den Mechanismus der Lipoproteinfreisetzung bei der Δ/lgt -Mutante zu untersuchen, wurden von acht extrazellulären Lipoproteinen der N-Terminus durch N-terminale Sequenzierung bestimmt. Es zeigte sich, dass bei fünf dieser Proteine das Signalpeptid vor dem Cystein der Lipobox und somit an der für die SPase II vorhergesagten Schnittstelle prozessiert wurde. Bei den Lipoproteinen OppA und Lmo0135 konnte trotz Wiederholung keine eindeutige N-terminale Sequenz ermittelt werden, was auf eine Inhomogenität der Spots hindeutete. Das Lipoprotein Lmo2219, das in zwei getrennten Proteinspots identifiziert werden konnte, wies eine uneinheitliche Prozessierung auf. Während bei dem Spot 1 ebenfalls das Signalpeptid an der für die SPase II vorhergesagten Schnittstelle prozessiert wurde, wurde das Signalpeptid bei Spot2 eine Aminosäure vor dem Cystein geschnitten (Abb.3.28).

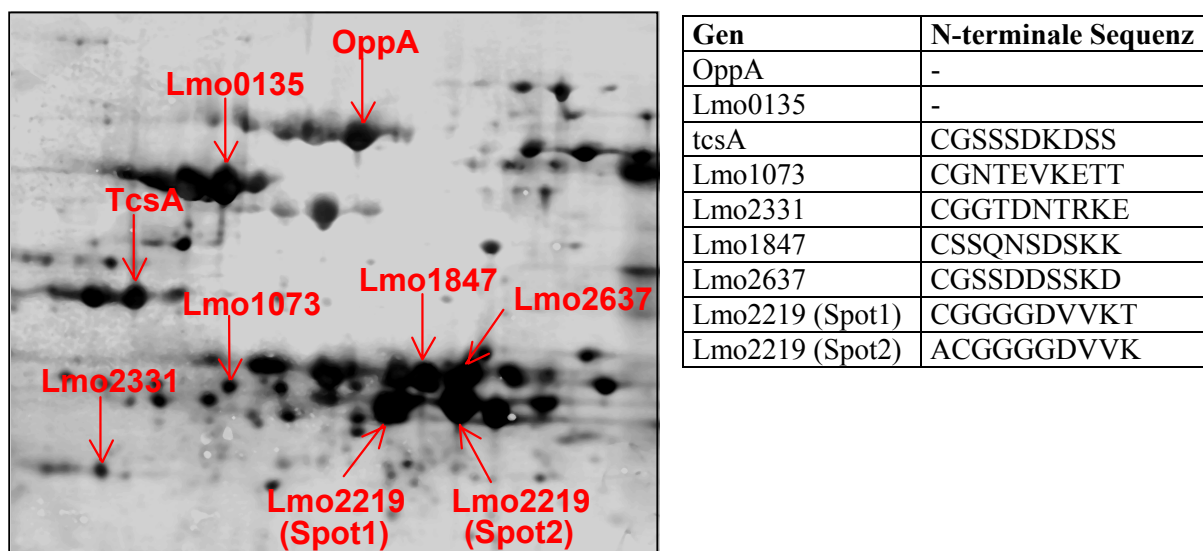


Abbildung 3.28 : Westernblot der im Kulturüberstand der Δ/lgt -Mutante befindlichen Proteine. Nach Anzucht der Bakterien in BHI wurden die im Kulturüberstand befindlichen Proteine mit Hilfe einer TCA/Acetonfällung extrahiert und über eine 2D-PAGE aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Coomassie G-250 angefärbt. Von neun mit Pfeilen markierten Proteinspots wurde der N-Terminus bestimmt. In der Tabelle sind die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung aufgeführt.

Die Untersuchungen der N-Termini der freigesetzten Lipoproteine deuteten darauf hin, dass die SPase II die Signalpeptide der Lipoproteine auch ohne die Lipidmodifizierung durch Lgt prozessiert. Da dieses im Widerspruch mit der Literatur steht, in der die Modifizierung durch Lgt als Voraussetzung für die Prozessierung der SPase II beschrieben wird (Tokunaga et al., 1984; Dev et al., 1984; Hussain et al., 1980), wurde nach einem weiteren Beleg für diese abweichenden Ergebnisse gesucht.

Die SPase II kann spezifisch durch das Antibiotikum Globomycin in ihrer Funktion gehemmt werden (Inukai et al., 1978; Dev et al., 1984; Sankaran et al., 1994). Daher sollte in einer weiteren Proteomanalyse überprüft werden, ob die Signalpeptidase, die für die Prozessierung der freigesetzten Lipoproteine der Δlgt -Mutante verantwortlich ist, ebenfalls durch Globomycin inhibiert werden kann. Die Δlgt -Mutante wurde hierzu in Anwesenheit von Globomycin (100µg/ml) bis zum Erreichen der stationären Phase angezogen und die im Kulturüberstand befindlichen Proteine wurden über eine 2D-PAGE aufgetrennt. Nach Visualisierung der Proteinspots mit Hilfe der RuPBS-Färbung wurde deutlich, dass durch die Behandlung mit Globomycin die Freisetzung der Lipoproteine weitgehend unterdrückt wurde. Das extrazelluläre Proteinmuster war nun wiederum vergleichbar mit dem des Wildtypstammes bzw. der komplementierten Δlgt -Mutante (Abb.3.29). Nur die zwei Lipoproteine Lmo0135 und Lmo2219 (Spot2) waren trotz der Behandlung mit Globomycin verstärkt in dem Kulturüberstand wiederzufinden. Die Signalsequenzen dieser beiden Proteine offenbarte jedoch keine Besonderheiten, die dieses Phänomen hätten erklären können.

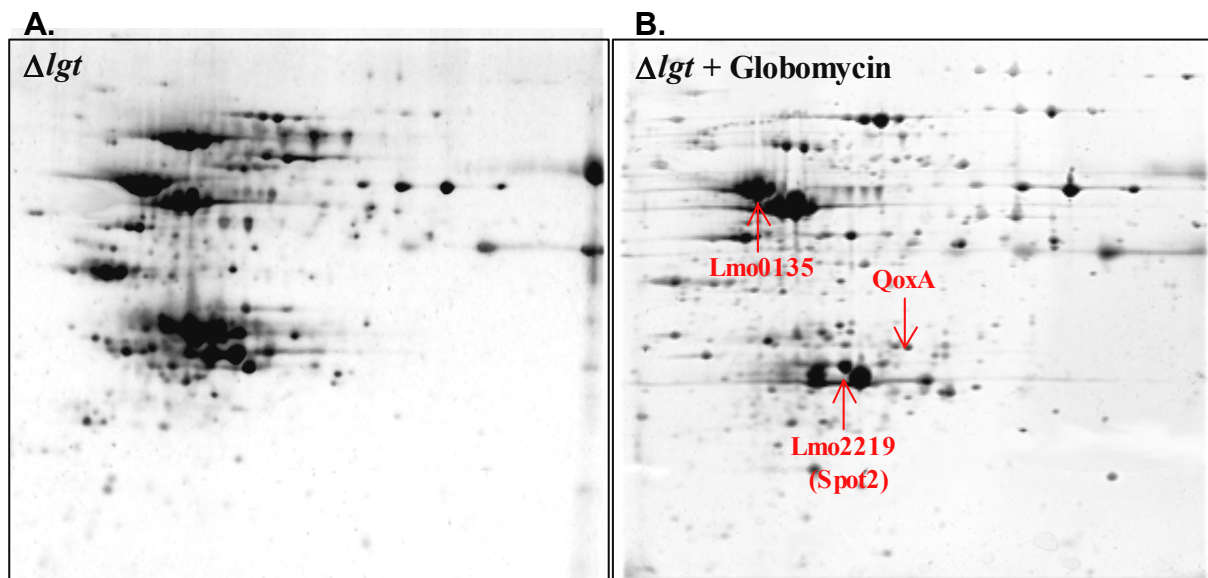


Abbildung 3.29: Vergleich des extrazellulären Proteoms der Δlgt -Mutante mit und ohne Zugabe von Globomycin. *L. monocytogenes* wurde in Abwesenheit (A.) und in Anwesenheit (B.) des Antibiotikums Globomycin bis zum Erreichen der stationären Phase angezogen. Die extrazellulären Proteine wurden aus dem Überstand mit Hilfe einer TCA/Acetonfällung isoliert, über eine 2D-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von RuPBS angefärbt. Durch die Globomycinbehandlung wird die Freisetzung der Lipoproteine weitgehend unterdrückt.

Die Freisetzung der Lipoproteine bei der Δlgt -Mutante ist somit abhängig von einer Signalpeptidase, die die Lipoproteine an der für die SPaseII vorhergesagten Schnittstelle prozessiert und zudem durch das SPase II-spezifische Antibiotikum Globomycin gehemmt wird.

4. Diskussion

4.1. Verfahren zur Analyse von Membranproteinen

Ausgangspunkt der erfolgreichen Charakterisierung der Membranproteine von *L. monocytogenes* war die Etablierung eines geeigneten Protokolls zur Anreicherung der Membranproteine. Als besonders problematisch erwies sich hierbei die Trennung der ribosomalen Proteine von der Membranfraktion. Trotz verschiedener Waschschr tte war es zunächst nicht möglich, die in sehr großen Kopieanzahlen vorkommenden basischen Proteine von der Membranfraktion zu lösen. Eine ähnliche Beobachtung zeigte sich bei der Subproteomanalyse der Zellmembran von *Saccharomyces cerevisiae* (Navarre et al., 2002). Auch mit Hilfe spezieller Aufreinigungsverfahren war es Navarre et al. nicht möglich, eine ribosomenfreie Membranfraktion zu erzielen. So befanden sich unter den 50 identifizierten Proteinen der Membranfraktion von *Saccharomyces cerevisiae* 22 ribosomale Proteine. Im Verlauf dieser Arbeit wurde im Vergleich dazu ein sehr erfolgreiches Trennverfahren etabliert. Hierbei wurden die Ribosomen zunächst durch die Anwesenheit divalenter Kationen im Probenpuffer stabilisiert und schließlich als ganze Einheit von der Membranfraktion separiert. Mit Hilfe dieser Methode war es sogar möglich, den Anteil der ribosomalen Proteine an dem Gesamtproteinanteil der Membranfraktion unter 5% zu halten. Die Etablierung eines geeigneten Protokolls für die Anreicherung der Membranproteine und die Trennung von vermeintlich zytoplasmatischen Verunreinigungen erwies sich für die Analyse der Membranproteine als dringend erforderlich. Denn wie bereits bei vielen anderen Organismen gezeigt wurde, lagen auch die listeriellen Membranproteine im Vergleich zu einigen zytoplasmatischen Proteinen in relativ geringer Kopieanzahl in der Zelle vor. Nur mit Hilfe dieser speziellen Subfraktionierung war es schließlich möglich, integrale Membranproteine für die verschiedenen Analyseverfahren zugänglich zu machen.

Das weitaus größere Problem bei der Analyse der Membranproteine steht jedoch im Zusammenhang mit dem hydrophoben Charakter dieser Proteinfraction. Integrale Membranproteine lassen sich entweder gar nicht oder nur vorübergehend mit den Detergenzien, die mit der isoelektrischen Fokussierung kompatibel sind, in Lösung bringen. Daher ist eine Auftrennung dieser Proteine mittels der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese in den meisten Fällen nicht möglich (Santoni et al., 2000). Um die

Zusammensetzung der listeriellen Membranproteine analysieren zu können, wurde daher auf alternative Trennverfahren zurückgegriffen, deren Vor- und Nachteile im Folgenden diskutiert werden:

Zu Beginn der Arbeit wurde die 16BAC/SDS-Gelelektrophorese für die Analyse der aufgereinigten Membranfraktion von *L. monocytogenes* eingesetzt. Durch die Identifizierung von 31 dominanten Proteinspots wurde deutlich, dass der Anteil der aufgetrennten integralen Membranproteine gemessen an dem Anteil der membranassoziierten Proteine verhältnismäßig gering war. Obwohl Hartinger et al. (1996) zeigen konnten, dass mit Hilfe dieses Systems auch Proteine mit bis zu zwölf Transmembrandomänen aufgetrennt werden können, befanden sich unter den identifizierten integralen Membranproteinen mit Ausnahme von Lmo1740 ausschließlich Proteine, für die lediglich eine oder zwei Transmembrandomänen vorhergesagt wurden. Dieses zeigt, dass das kationische Detergens 16BAC generell in der Lage ist, auch sehr hydrophobe Proteine in Lösung zu bringen, jedoch im Falle eines komplexen Proteingemisches über ein begrenztes Solubilisierungsvermögen für die hydrophoben Membranproteine verfügt. Bei einer komplexen Proteinprobe reicht dieses Solubilisierungsvermögen offensichtlich nicht aus, um eine gleichmäßige Lösung der hydrophilen und hydrophoben Proteine zu erlangen.

Ein weiterer Nachteil der 16BAC/SDS-PAGE ist das geringe Auflösungsvermögen dieses Systems. Es konnten zwar bis zu 100 einzelne Proteinspots in dem Gel aufgetrennt werden, aber dennoch reicht das Auflösungsvermögen nicht annähernd aus, um das komplexe Membranproteom mit seinen weit über 600 erwarteten Proteinen zu analysieren. So wurden in scheinbar vereinzelt Proteinspots unterschiedliche Proteine identifiziert. Ein solches Phänomen erschwert insbesondere die Quantifizierung der Proteine. Außerdem könnte bei einem Vergleich zweier Varianten in einem solchen Fall nicht eindeutig geklärt werden, ob eventuelle Unterschiede im Expressionsmuster auf das eine, das andere oder sogar auf beide Proteine zurückzuführen sind.

Mit Ausnahme solcher Fälle bietet dieses System jedoch die Möglichkeit anhand der Intensität und des Volumens eines Proteinspots, Aussagen über die relative Expressionsstärke des entsprechenden Proteins zu machen. So kann man davon ausgehen, dass die im 16BAC/SDS-Referenzgel identifizierten Proteine sehr dominante Membrankomponenten von *L. monocytogenes* unter den entsprechenden Anzuchtbedingungen darstellen. Bei dem Vergleich der Membranproteine der unterschiedlich PrfA-exprimierenden Stämme zeigte sich, dass die 16BAC/SDS-PAGE allerdings nur bedingt für vergleichende

Expressionsanalysen geeignet ist. Aufgrund einer unterschiedlichen horizontalen Streifenbildung und im Vergleich zu den klassischen 2D-Gelen schlecht fokussierten Spots war die genaue Quantifizierung einiger Proteinspots und somit ein spezifischer Vergleich der zwei Varianten nicht möglich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 16BAC/SDS-PAGE im Allgemeinen für die Auftrennung von hydrophoben Proteinen geeignet ist, jedoch bei der Analyse eines komplexen Proteingemisches, wie z.B. dem Membransubproteom eines Bakteriums, nur sehr begrenzt eingesetzt werden kann.

Die Membranfraktion von *L. monocytogenes* wurde weiterhin mit Hilfe eines gellosen Ansatzes untersucht. Dieses Verfahren ermöglichte einen schnellen und dennoch sicheren Nachweis von insgesamt 43 Proteinen. Es zeigte sich, dass der gellose Ansatz auch für die Analyse von sehr hydrophoben Proteinen geeignet ist. So befanden sich unter den 43 identifizierten Proteinen 20 integrale Membranproteine mit bis zu zwölf putativen Transmembrandomänen. Ein weiterer Vorteil der gellosen Analyse ist das im Vergleich zu der 16BAC/SDS-PAGE relativ große Auflösungsvermögen des Verfahrens. Leider wurde die entsprechende Technik (LC-MS/MS) erst im letzten Drittel der vorliegenden Arbeit in der Arbeitsgruppe etabliert. Die Experimente wurden noch während der Einarbeitungsphase des LC-MS/MS-Systems durchgeführt, wodurch sich die verhältnismäßig geringe Ausbeute an analysierten Peptiden und Proteinen erklären lässt. Arbeitsgruppen, die sich bereits länger mit dieser Technik beschäftigen, ist es bereits gelungen, weit über einhundert Proteine in einer einzigen Proteinfraction nachzuweisen (Blonder et al., 2002; Goshe et al., 2003). Unter Einsatz von 2D-LC-MS/MS-Verfahren konnten einige spezielle Arbeitsgruppen sogar bis zu eintausend Proteine in einer komplexen Proteinfraction analysieren (Wachburn et al., 2001; Wu und Yates, 2003).

Durch die Entwicklung verschiedener Quantifizierungsverfahren ist es mittlerweile möglich, ebenfalls vergleichende Expressionsanalysen auf der Basis gelloser LC-MS/MS-Analysen durchzuführen. Zu diesen Quantifizierungsverfahren gehört z.B. die ICAT (Isotope Coded Affinity Tag)-Methode (Gygi et al., 1999), die GIST (Global Internal Standard Technology)-Methode (Chakraborty et al., 2002), die MCAT (Mass Coded Affinity Tagging)-Methode (Cagney und Emili, 2002), die „¹⁸O-Labelling“-Methode (Yao et al., 2001; Stewart et al., 2001) und die AQUA (Absolute Quantification Analysis)-Methode (Gerber et al., 2003; Barnidge et al., 2003). All diese Methoden weisen jedoch Limitationen auf, so dass vergleichende Expressionsanalysen nur in einem begrenzten Rahmen durchgeführt werden

können. Zur Zeit steht auch kein standardisierter Ansatz basierend auf gellosen Verfahren zur absoluten Quantifizierung der Proteine zur Verfügung.

Ein weiterer Nachteil der gellosen Analyse gegenüber den gelbasierenden Verfahren besteht darin, dass die gellose Analyse in der Regel keine Information über die strukturelle Integrität der Proteine liefert. Die oben genannten 43 Proteine wurden jeweils nur anhand eines oder anhand von zwei Peptiden identifiziert. Ob diese Peptide nun von Proteinfragmenten oder von „unversehrten“ Proteinen stammen, bleibt unklar. Aufgrund der geringen Sequenzabdeckung können auch nur wenige Informationen über posttranslationale Modifikationen der Proteine gewonnen werden. Bei der gellosen Analyse von integralen Membranproteinen ist es insbesondere schwierig, eine hohe Sequenzabdeckung zu erzielen. Die Transmembrandomänen der Proteine sind aufgrund ihrer Einbettung in die Membran nur schwer für die proteolytischen Enzyme zugänglich. Außerdem fehlen ihnen häufig die spezifischen Schnittstellen für die Proteasen. Die Standardprotease Trypsin spaltet z.B. ausschließlich hinter den beiden geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin, die nur selten in den hydrophoben Regionen der Proteine vorliegen. Daher entstehen meist sehr große unlösliche Fragmente, die für die LC-MS/MS-Analyse nicht zugänglich sind. Eine Möglichkeit, um eine höhere Sequenzabdeckung bei den integralen Membranproteinen zu erreichen, stellt die Kombination aus Cyanobromid und Trypsin dar. Durch die Behandlung der Membranproteine mit Cyanobromid entstehen zunächst sehr große Proteinfragmente, die anschließend mit Hilfe von Trypsin in kleinere Fragmente zerlegt werden können (Washburn et al., 2001). Eine Sequenzabdeckung von über 20% wird jedoch trotz verschiedener Optimierungen bisher nur bei sehr wenigen Proteinen erreicht (Wu et al., 2003; Blonder et al., 2004).

Insgesamt gesehen stellt die gellose Analyse ein vielversprechendes Verfahren zur schnellen und automatisierbaren Analyse des Membransubproteoms dar. Allerdings ist auch mit Hilfe dieser Verfahren zur Zeit noch keine umfassende Analyse der Membranproteine möglich, da Informationen hinsichtlich der Expressionsstärke und der Integrität der Proteine fehlen.

Aufgrund der Probleme, die sowohl bei der gelbasierten als auch bei der gellosen Analyse der unterschiedlich PrfA-exprimierenden Stämme festzustellen waren, wurde schließlich auf eine Kombination zwischen einer eindimensionalen SDS-PAGE und der LC-MS/MS-Analyse zurückgegriffen. Es stellte sich heraus, dass dieses Verfahren die gleichen Vorteile wie der gellose Ansatz besitzt. Zum einen konnten mit Hilfe des anionischen Detergens SDS auch hydrophobe Proteine mit bis zu 12 Transmembrandomänen aus dem Membranpellet

herausgelöst und somit der weiteren Analyse zugänglich gemacht werden. Zum anderen zeigte sich, dass dieses Verfahren im Vergleich zu der 16BAC/SDS-PAGE über ein sehr großes und zudem variables Auflösungsvermögen verfügt. Obwohl das SDS-Gel in nur drei Fraktionen unterteilt wurde, konnten insgesamt 89 Proteine mit Hilfe dieses Verfahrens aus der aufgereinigten Membranfraktion von *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Zhao et al. (2004) zeigten bei Untersuchungen der Plasmamembran von H1299-Zellen, dass die Anzahl der identifizierten Proteine durch die Unterteilung des SDS-Gels in mehrere Fraktionen noch in einer beeindruckenden Weise gesteigert werden kann. So war es Zhao et al. schließlich möglich, in 49 Gel-Fraktionen insgesamt 898 Proteine zu identifizieren.

Ein Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der gellosen Analyse besteht darin, dass durch die Gelfraktionierung auch Informationen über den Fragmentierungszustand der Proteine gewonnen werden können. In der Fraktion 3 (8-24kDa) konnten z.B. Peptide von Proteinen nachgewiesen werden, deren theoretisches Molekulargewicht weit über 24 kDa liegt. Die identifizierten Peptide müssen folglich von Proteinen stammen, die zuvor degradiert und daher auf einer niedrigeren Molekulargewichtsebene in dem SDS-Gel aufgetrennt wurden.

Ähnlich wie bei der gellosen Analyse stellt auch bei diesem Verfahren die Quantifizierung der Proteine ein großes Problem dar. Anhand des 1D-Bandenmusters kann nur eine grobe Schätzung von hoch und niedrig exprimierten Proteinen vorgenommen werden, da bei der eindimensionalen Auftrennung einer komplexen Proteinprobe davon ausgegangen werden muss, dass sich die angefärbten Banden stets aus mehreren Proteinen zusammensetzen.

Bei der Analyse des Membransubproteoms der zwei unterschiedlich PrfA-exprimierenden Stämme konnten keine signifikanten Unterschiede im Bandenmuster der beiden Varianten ermittelt werden. Durch die anschließende LC-MS/MS-Analyse der drei Gelfragmente wurden jedoch einige Proteine identifiziert, die ausschließlich in dem Wildtypstamm nachgewiesen werden konnten. Unter diesen putativ PrfA-regulierten Proteinen befand sich unter anderem das Posttranslokationschaperon Lmo2219, das zum einen bei den späteren gelbasierenden Untersuchungen im Kapitel 3.5. und zum anderen bei den Transkriptionsanalysen von Milohanic et al. (2003) als PrfA-reguliert bestätigt werden konnte. Bei den weiterführenden Analysen in der Diplomarbeit von Elmar Fischer (GBF Braunschweig, 2004) konnte zudem gezeigt werden, dass ausschließlich in den Gelfragmenten des Wildtypstammes Peptide des PrfA-abhängigen Virulenzfaktors ActA identifiziert werden konnten. Dieses zeigt, dass die Kombination aus SDS-Gel und LC-MS/MS-Analyse trotz der bestehenden Limitationen zur quantitativen Analyse für den Vergleich der beiden Varianten geeignet ist. Es können zwar mit Hilfe dieses Verfahrens

keine genauen Regulationsfaktoren ermittelt werden, jedoch ermöglicht es durch die Detektion von Veränderungen im Proteinmuster, Gene einem bestimmten Regulon zuordnen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine umfassende Membranproteinanalyse, die eine vergleichende Expressionsanalyse einschließt, aufgrund der genannten Limitationen mit Hilfe dieser alternativen Verfahren zur Zeit noch nicht möglich ist. Allerdings stellt sowohl die gellose Analyse als auch die Kombination aus SDS-Gel und LC-MS/MS-Analyse jeweils ein vielversprechendes Verfahren zur Katalogisierung des Membransubproteoms von *L. monocytogenes* und anderen Organismen dar. Die 16BAC/SDS-Page ist hingegen eher für die Analyse weniger komplexer Proben geeignet.

4.2. Identifizierung listerieller Membranproteine

Insgesamt wurden 103 Proteine aus der aufgereinigten Membranfraktion von *L. monocytogenes* identifiziert (siehe Tabelle 8.1, im Anhang). Für 39 dieser Proteine wurden von Arai et al. (2002) eine oder mehrere Transmembrandomänen vorhergesagt, und 38 dieser Proteine wurden aufgrund ihrer Funktion bzw. hohen Homologie zu bereits identifizierten Proteinen anderer Organismen in die Gruppe der membranassoziierten Proteine eingestuft. Drei weitere Proteine besaßen ein für sekretorische Proteine typisches Signalpeptid. Die Membranlokalisierung dieser drei Proteine könnte daher auf Interaktionen mit dem Sekretionssystem der Membran zurückgeführt werden. Bei den restlichen 23 der 103 identifizierten Proteine kann nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich hierbei um verbliebene zytoplasmatische Verunreinigungen handelt oder ob diese Proteine eventuell spezifisch mit der Membran assoziiert sind. Die 23 Proteine unterteilen sich in 6 Proteine mit einer unbekannten Funktion und 17 Proteine, die aufgrund ihrer Funktion im Zytoplasma der Bakterien zu erwarten wären. Dazu gehören unter anderem die Chaperone DnaK und GroEL, der Translationselongationsfaktor EF-Tu, die Pyruvatdehydrogenaseuntereinheit PdhD und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gap). Auffällig bei diesen sechs Proteinen ist, dass sie ebenfalls in großen Mengen in verschiedenen Oberflächenextrakten von *L. monocytogenes* nachgewiesen werden konnten (Doktorarbeit Jessica Schaumburg, GBF Braunschweig, 2003). Auch bei anderen grampositiven Bakterien wurden diese Proteine oder zumindest sehr ähnliche zytoplasmatische Proteine in Oberflächenextrakten entdeckt. Als

Beispiel wären hier die Elongationsfaktoren TU (Tuf) und TS (Fus), die Pyruvatdehydrogenaseuntereinheit PdhB und die Chaperone GroEL, GroES und DnaK von *Mycobacterium tuberculosis* zu nennen, die bei dem Tuberkuloseerreger als Antigene beschrieben werden (Rosenkrands et al., 2000; Vytvytsko et al., 2002). Typische zytoplasmatische Proteine, wie z.B. die Enolase, die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und das Chaperonin GroEL wurden weiterhin in Oberflächenextrakten von Streptokokken nachgewiesen (Pancholi und Fischetti, 1992; Bergmann et al., 2001). In beiden Fällen nehmen die Autoren für diese Proteine eine gezielte Expression und eine zusätzliche Funktion auf der Bakterienoberfläche an. Auch für *L. monocytogenes* sind diese sogenannten „schwarzarbeitenden“ Proteine denkbar (Schaumburg et al., 2004). Über die Art der Freisetzung dieser Proteine ist allerdings noch wenig bekannt. Zum einen wird über die Freisetzung durch Zelllyse einiger Bakterien und eine anschließende Reassoziierung der Proteine an die Oberfläche lebender Zellen spekuliert, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass diese Proteine durch einen bislang noch unbekannten Transportweg über die Membran an die Bakterienoberfläche gelangen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass der Nachweis dieser Proteine in der aufgereinigten Membranfraktion von *L. monocytogenes* auf Interaktionen mit bisher unbekannten Transportmechanismen zurückzuführen ist. Als mögliche Transportwege für die „schwarzarbeitenden“ Proteine werden unspezifische Peptidtransporter (Kuchler et al., 1993) oder mechanosensitive Kanäle (Sukharev et al., 1997) diskutiert. Ein mechanosensitives Kanalsystem (MscL) konnte zumindest unter den 39 identifizierten und somit sehr dominanten integralen Membranproteinen von *L. monocytogenes* entdeckt werden.

Die Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Einteilung der 103 identifizierten Proteine in verschiedene funktionelle Kategorien (nach Glaser et al., 2001). Die am häufigsten vertretene funktionelle Gruppe unter den identifizierten Proteinen stellt die Gruppe „Transport/Bindeproteine und Lipoproteine“ dar. Diese Gruppe setzt sich größtenteils aus ABC-Transportkomponenten zusammen. Insgesamt wurden bei den Untersuchungen der aufgereinigten Membranfraktion und der Lipoproteinanalyse 33 Bestandteile von verschiedenen ABC-Transportsystemen mit unterschiedlicher Substratspezifität in der aufgereinigten Membranfraktion von *L. monocytogenes* nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurden nur zwei Komponenten verschiedener Phosphotransferasesysteme identifiziert. Dieses deutet darauf hin, dass die Substrataufnahme bei *L. monocytogenes* vorwiegend durch die Familie der ABC-Transportsysteme koordiniert wird.

Tabelle 4.1 : Einteilung der 103 identifizierten Proteine der aufgereinigten Membranfraktion von *L. monocytogenes* in funktionelle Kategorien. Die proteinkodierenden Gene von *L. monocytogenes* wurden von Glaser et al. (2001) in insgesamt 44 funktionelle Kategorien (**Kat.**) aufgeteilt (Glaser et al., 2001).

Funktionelle Kategorie	Kat.	Anzahl der identifizierten Proteine
Zellhülle und zelluläre Prozesse		
Zellwand	1.1	5
Transport/Bindungsproteine u. Lipoproteine	1.2	34
Membranbioenergetik	1.4	7
Proteinsekretion	1.6	2
Zellteilung	1.7	5
Zelloberflächenproteine	1.8	1
Intermediärstoffwechsel		
Spezifische Reaktionswege u.a.	2.1.1	1
Glykolyse	2.1.2	2
Aminosäurestoffwechsel u.a.	2.2	4
Nukleotid- und Nukleinsäurestoffwechsel	2.3	2
Lipidstoffwechsel	2.4	2
Informationswege		
DNA-Rekombination	3.3	2
DNA-Packung und Segregation	3.4	1
Proteinmodifikation	3.8	1
Proteinfaltung	3.9	3
Regulation	3.5.2	1
Elongation	3.7.4	1
Andere Funktionen		
Adaption an untypische Bedingungen	4.1	3
Detoxifikation	4.2	1
Diverses	4.5	1
Ähnlichkeiten zu unbekannten Proteinen		
Ähnlichkeit zu anderen Organismen	5.2	21
Keine Ähnlichkeit		
<i>L. monocytogenes</i> spezifisch	6	3

Da für die ABC-Transportsysteme aber auch für viele andere zelluläre Prozesse Energie in Form von ATP benötigt wird, ist es nicht verwunderlich, dass als eine der Hauptproteinkomponenten der listeriellen Membran der ATP-Synthase-Komplex identifiziert wurde. Der ATP-Synthase-Komplex setzt sich aus einer membrandurchspannenden Untereinheit (F₀-Untereinheit) und einer membranassoziierten Untereinheit (F₁-Untereinheit) zusammen. Während es mit Hilfe der BN/SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.2.4) sogar möglich war, Bestandteile der F₁-Untereinheit im Komplex nachzuweisen, konnte mit dem gellosen Ansatz sowie der Kombination aus eindimensionaler SDS-PAGE und LC-MS/MS-Analyse ebenfalls ein Bestandteil (AtpF) der F₀-Untereinheit identifiziert werden. Weiterhin wurden

aus der funktionellen Kategorie „Membranbioenergetik“ drei Bestandteile der Elektronentransportkette (Lmo2718, Lmo2638, Lmo0355) in der aufgereinigten Membranfraktion von *L. monocytogenes* nachgewiesen.

Nennenswert neben diesen beiden Kategorien sind zudem die Kategorien „Ähnlichkeit zu unbekannten Proteinen“ und „Keine Ähnlichkeit“, in die insgesamt 24 der 103 identifizierten Proteine eingeordnet wurden. Obwohl diese Proteine offenbar zu den dominantesten Proteinkomponenten der listeriellen Membranfraktion zählen, ist ihre Funktion und Bedeutung an den zellulären Prozessen bislang unbekannt. Bei 23 dieser Proteine wurden homologe Sequenzen in anderen Organismen entdeckt, allerdings konnten auch hier noch keine funktionellen Domänen der Proteine charakterisiert werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht noch einmal, wie wenig bislang über die Proteinkomponenten der bakteriellen Zellmembranen bekannt ist.

Bei dem Protein Lmo1597 konnten weder in dem Genom der apathogenen Spezies *L. innocua* noch in anderen bereits sequenzierten Bakterien homologe Sequenzen ermittelt werden. Hierbei scheint es sich um ein *L. monocytogenes* spezifisches Protein zu handeln, das daher einen interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen darstellt.

Putativ PrfA-regulierte Membranproteine

Da die bekannten Virulenzfaktoren ActA, Hly, PlcA, PlcB, Mpl, InlA und InlB alle unter der Kontrolle des positiven Transkriptionsregulators PrfA stehen, bietet die Suche nach PrfA-regulierten Proteinen eine vielversprechende Möglichkeit, um weitere an der Virulenz des Erregers beteiligte Proteine zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit konnten durch den Vergleich der aufgereinigten Membranfraktion einer *prfA*-Deletionsmutante und des Wildtypstammes einige putativ PrfA-regulierte Proteine detektiert werden. Zu diesen Proteinen gehört das bereits erwähnte Protein Lmo2219, das sowohl bei den gelbasierenden Untersuchungen unter 3.1.3. als auch bei den Transkriptionsanalysen von Milohanic et al. (2003) als positiv PrfA-reguliert bestätigt werden konnte. Bei dem Protein Lmo2219 handelt es sich um ein Homolog des Posttranslokationschaperon PrsA von *Bacillus subtilis*, das für die extrazelluläre Faltung translozierter Proteine verantwortlich ist (Tjalsma et al., 2000). Die positive PrfA-Regulation steht daher wahrscheinlich im Zusammenhang mit der erhöhten Expression und Sekretion der Virulenzfaktoren. Bei den essentiellen Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* handelt es sich nämlich ausschließlich um Oberflächenproteine (ActA,

InlA, InlB) und sekretorische Proteine (Hyl, PlcA, PlcB, Mpl), die zur Ausübung ihrer Funktion zunächst über die Membran transloziert und anschließend wahrscheinlich entsprechend gefaltet werden müssen.

Da die essentiellen Virulenzfaktoren alle über ein typisches Signalpeptid verfügen, erfolgt die Translokation dieser Proteine vermutlich über das Sec-abhängige Sekretionssystem, das sowohl bei gramnegativen als auch bei grampositiven Bakterien bereits ausführlich analysiert worden ist (Oliver und Beckwith, 1982; Tjalsma et al., 2000). Auch in dem Genom von *L. monocytogenes* sind die proteinkodierenden Sequenzen der Sec-abhängigen Sekretionsmaschinerie vorhanden. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls das Tunnelprotein SecDF (Lmo1527) der Sec-abhängigen Sekretionsmaschinerie als scheinbar positiv PrfA-reguliert identifiziert. Obwohl die Promotorregion von lmo1527 keine putative PrfA-Box aufweist, kann eine indirekte PrfA-Regulation nicht ausgeschlossen werden. So konnten Mihohanovic et al. (2003) bei den Transkriptionsanalysen unterschiedlich PrfA-exprimierender Stämme ebenfalls bei mehreren Genen eine indirekte PrfA-Regulation feststellen, die vermutlich mit dem Sigmafaktor B im Zusammenhang steht (Nadon et al., 2002). Die putative PrfA-Regulation von lmo1527 ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass nicht nur das extrazelluläre Chaperon Lmo2219 PrfA-abhängig exprimiert wird, sondern eventuell die Expression mehrerer Bestandteile des Sec-abhängigen Sekretionsapparates zugunsten einer effektiveren Sekretion der Virulenzfaktoren während der Infektion erhöht wird. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass in der Abteilung im Rahmen der Diplomarbeit von Elmar Fischer bereits der Translokationsmotor SecA identifiziert werden konnte und auf eine PrfA-abhängige Expression überprüft wird.

Weiterhin konnten Hinweise auf eine PrfA-Regulation der Proteine Lmo0355, Lmo1649, MscI, AtpF und AtpD ermittelt werden. Von den korrespondierenden Gensequenzen dieser Proteine weist nur *atpD* eine putative PrfA-Box auf. Eine PrfA-Regulation der F₀F₁-ATPase könnte eventuell im Zusammenhang mit der Säuretoleranz der Bakterien stehen. So konnte bereits bei verschiedenen Bakterienarten eine Beteiligung der F₀F₁-ATPase an der Ausbildung der Säuretoleranz demonstriert werden (Sullivan und Condon, 1999). Ebenso konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Säuretoleranz und der Virulenz von *L. monocytogenes* besteht (O'Driscoll et al., 1996; Marron et al., 1997; Gahan und Hill, 1999). Bei dem Lipoprotein Lmo0355 konnte durch Antikörper-Analysen (s. Kapitel 3.2.6.) eine PrfA-Regulation nicht bestätigt werden.

4.3. Analyse der Lipoproteine

Bei den Lipoproteinen handelt es sich um membranassoziierte Proteine, die über eine Lipidmodifizierung in der Membran verankert sind. Sie stellen mit ihren 68 putativen Kandidaten die größte Gruppe der insgesamt 133 vorhergesagten Oberflächenproteine von *L. monocytogenes* dar (Glaser et al., 2001). Oberflächenproteine spielen generell eine besondere Rolle bei den Wirts-Pathogen-Interaktionen, da sie in direktem Kontakt mit den Wirtskomponenten stehen. Auch unter den 68 vorhergesagten Lipoproteinen von *L. monocytogenes* befinden sich viele Proteine, die aufgrund einer putativen PrfA-Box, dem Fehlen eines Orthologs in der apathogenen Spezies *L. innocua* oder aufgrund einer besonderen Funktion, interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen darstellen. Während bei anderen pathogenen Bakterienarten, wie z.B. *Streptococcus pyogenes* (Elsner et al., 2002), bereits eine Beteiligung bakterieller Lipoproteine an der Virulenz der Erreger nachgewiesen werden konnte, war zu Beginn dieser Arbeit nur wenig über die listeriellen Lipoproteine und ihre Bedeutung im Infektionszyklus des intrazellulären Erregers bekannt.

Da die Lipoproteine jedoch nicht nur eine sehr interessante, bis dato noch nicht näher charakterisierte Proteingruppe repräsentierte, sondern aufgrund des Lipidankers ebenfalls die Möglichkeit einer spezifischen Identifizierung und genauen Gruppierung dieser Proteine bestand, wurde die Gruppe der Lipoproteine für weitere Analysen ausgewählt.

4.3.1. Verifikation der Lipoproteine

Die Annotierung durch Gensequenzanalysen stellt mittlerweile das Standardverfahren zur Erkennung bakterieller Lipoproteine dar. Sutcliffe und Harrington (2004) konnten anhand der Annotierung putativer Lipoproteine von *Streptococcus agalactiae* demonstrieren, wie viele Informationen in den Genomdaten enthalten sind. Dennoch können mit Hilfe dieser Daten nur Vermutungen bezüglich der posttranslationalen Modifizierung und der Expression der annotierten Proteine aufgestellt werden. Da die Gruppe der Lipoproteine bei den grampositiven Bakterien bis heute nur in einem sehr begrenzten Rahmen untersucht worden ist, existieren sehr wenige experimentell verifizierte Daten, die diese Vermutungen festigen. Bislang wurden in den Untersuchungen jeweils nur einzelne Lipoproteine experimentell verifiziert (Haandrikman et al., 1991; Bengtsson et al., 1999; Dòrazio et al., 2001), so dass die

Anzahl der experimentell bestätigten Lipoproteine bei den grampositiven Bakterien noch unter einhundert liegt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die dominantesten Lipoproteine von *L. monocytogenes* zu identifizieren und experimentell zu verifizieren. Als geeignete Methode zur Umsetzung dieses Ziels erwies sich ein Verfahren, das ursprünglich von Antelmann et al. (2001) für Untersuchungen von *B. subtilis* entwickelt wurde. Bei den Untersuchungen von *B. subtilis* wurde dieses Verfahren im Rahmen einer sehr umfangreichen Proteomanalyse zur Identifizierung verschiedener Oberflächenproteine beschrieben, aber noch nicht explizit als Verfahren zur Verifikation bakterieller Lipoproteine vorgestellt. Durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Verfahren optimal für den experimentellen Nachweis der Lipoproteine grampositiver Bakterien geeignet ist. Insgesamt konnten mit Hilfe dieses Verfahrens zum ersten Mal 24 Lipoproteine eines einzelnen grampositiven Bakteriums experimentell verifiziert werden. Zudem war es möglich, anhand der Spotvolumen und Spotintensitäten einen Überblick über die Expressionsstärken der einzelnen Lipoproteine zu erhalten. Antelmann et al. konnten durch Transkriptionsanalysen der vier Lipoprotein-kodierenden Gene *mntA*, *oppA*, *yxeB* und *yfiY* demonstrieren, dass die erhöhte Abgabe der Lipoproteine an das Außenmedium bei der Δlgt -Mutante nicht auf eine erhöhte Transkriptionsrate der korrespondierenden Gene zurückzuführen ist. Daher ist anzunehmen, dass die ermittelten Expressionsstärken auch die tatsächliche Lipoproteinverteilung der Zellmembran widerspiegeln.

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der experimentell verifizierten Lipoproteine durch die Verwendung von Zoomgelen und einer sensitiveren Nachweismethode, wie die Immunfärbung, noch weiter gesteigert werden kann. Allerdings ist es mit Hilfe dieser Methode nicht möglich, Lipoproteine nachzuweisen, die über eine oder mehrere zusätzliche Transmembrandomänen verfügen. Dieses konnte anhand des Beispiels QoxA gezeigt werden. Unter den 68 für *L. monocytogenes* annotierten Lipoproteinen befinden sich insgesamt 10 putative Lipoproteine, für die eine oder mehrere zusätzliche Transmembrandomänen vorhergesagt werden. Zudem verfügt eines der annotierten Lipoproteine (Lmo0821) über ein zusätzliches LPXTG-Motiv. Ob es sich hierbei tatsächlich um Lipoproteine handelt, bleibt unklar. In der Literatur existieren allerdings Beispiele für zwei Proteine (QoxA, CtaC) mit zusätzlichen Transmembrandomänen, die experimentell als Lipoproteine bestätigt werden konnten (Ma et al. 1997; Bengtsson et al., 1999). Nach Sutcliffe und Harrington (2004) könnte eine Lipidmodifikation integraler Membranproteine im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der korrekten Topologie dieser Proteine stehen.

Obwohl anzunehmen ist, dass unter den ausgewählten Kultivierungsbedingungen nicht alle Lipoproteine in großen Mengen exprimiert werden, war es trotzdem möglich, fast die Hälfte der mit dieser Methode zugänglichen Lipoproteine experimentell zu verifizieren.

4.3.2. Einfluss der Lipidmodifizierung auf den Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

Generell bieten sich zwei verschiedene Möglichkeiten an, um den Einfluss der Lipoproteine auf den Infektionszyklus von *L. monocytogenes* zu analysieren. Auf der einen Seite kann durch die Inaktivierung eines jeden Gens, das für ein putatives Lipoprotein kodiert, der Einfluss der einzelnen Proteine an der Virulenz der Bakterien analysiert werden. Bei einer Gruppe, die bis zu 68 Kandidaten aufweist, stellt dieser Ansatz jedoch ein sehr arbeitsintensives und zeitintensives Unterfangen dar. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, wie in der vorliegenden Arbeit eines der beiden Enzyme, das für die Maturation der Lipoproteine verantwortlich ist, zu deletieren. Auf diese Weise kann anhand einer einzelnen Deletionsmutante analysiert werden, ob die korrekte subzelluläre Lokalisation der Lipoproteine funktionell für die Virulenz von *L. monocytogenes* von Bedeutung ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prälipoprotein-Diacylglyceryl-Transferase (Lgt) von *L. monocytogenes* deletiert. Bei *E. coli* und *Salmonella typhimurium* konnte gezeigt werden, dass die Lipidmodifizierung durch Lgt essentiell für das Wachstum und die Lebensfähigkeit der gramnegativen Bakterien ist (Gan et al., 1993; Sankaran und Wu, 1994). Im Gegensatz dazu scheint bei den grampositiven Bakterien der erste Schritt in der Lipoproteinmodifizierung für das Überleben und die Vermehrung der Bakterien entbehrlich zu sein. Denn sowohl bei *B. subtilis* als auch bei *Streptococcus pneumoniae* konnten Lgt-inaktivierte Stämme generiert werden, die gegenüber dem jeweiligen Wildtypstamm keine Wachstumsnachteile im Vollmedium aufwiesen (Leskelä et al., 1999; Petit et al., 2001). Auch bei den Untersuchungen der Δ lgt-Mutante von *L. monocytogenes* zeigte sich, dass die Lipidmodifizierung durch Lgt keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien in dem Vollmedium BHI besitzt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die unmodifizierten Prälipoproteine bei den grampositiven Bakterien trotz des fehlenden Lipidankers teilweise an der Oberfläche der Bakterien zurückgehalten werden und somit zumindest partiell ihre Funktion ausüben können. Dieses wird zumindest für das Chaperon PrsA bei *Bacillus subtilis* vermutet (Leskelä et al., 1999). Denn obwohl bei der Δ lgt-Mutante von *B. subtilis* eine reduzierte Aktivität und verstärkte Abgabe von PrsA an das Außenmedium detektiert werden

konnte, erwies sich die Δlgt -Mutante als lebensfähig, während die Deletion von *prsA* bei *B. subtilis* letal ist (Kontinen und Sarvas, 1993; Leskelä et al., 1999).

Durch die Infektionsversuche mit der Δlgt -Mutante konnte gezeigt werden, dass die Lipoproteinmodifizierung keinen Einfluss auf das Wachstum der Listerien in BHI besitzt, jedoch eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Vermehrung der Bakterien spielt. So konnte bei der Δlgt -Mutante im Vergleich zu dem Wildtypstamm ein deutlich reduziertes intrazelluläres Wachstum festgestellt werden. Eine ähnliche Beobachtung zeigte sich bei den Mausinfektionsanalysen der Δlgt -Mutante von *Streptococcus pneumoniae* (Petit et al., 2001). Auch hier wies die Δlgt -Mutante im Vergleich zu dem Wildtypstamm ein stark reduziertes Wachstum in dem Respirationstrakt infizierter Mäuse auf. Dieses zeigt, dass Lipoproteine generell wichtige Funktionen bei den Infektionszyklen dieser beiden Erreger übernehmen. Ob der Unterschied in der intrazellulären Vermehrung der Δlgt -Mutante von *L. monocytogenes* auf ein oder auf mehrere Lipoproteine zurückzuführen ist, konnte durch diesen Versuch nicht geklärt werden. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere Lipoproteine identifiziert, deren funktionelle Beeinträchtigung einen Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung der Δlgt -Mutante haben könnte:

a. Einfluss wichtiger ABC-Transportsysteme

Denkbar in diesem Zusammenhang ist zum einen eine beeinträchtigte Funktion wichtiger ABC-Transportsysteme, die zwar bei dem Wachstum der Listerien in der nährstoffreichen Umgebung des BHI-Mediums noch keine Auswirkungen zeigt, jedoch von Bedeutung für die Nährstoffaufnahme im intrazellulären Milieu ist. Interessanterweise wurden unter den 24 identifizierten Lipoproteinen des Kapitels 3.2.3.3. gleich drei Proteine (Lmo1073, Lmo0541, Lmo2431) gefunden, die von Glaser et al. (2001) als Substratbindungsproteine spezieller Eisen-ABC-Transportsysteme annotiert worden sind. Da im Wirtsgewebe und in den eukaryotischen Zellen Eisen vorwiegend in komplexer Form vorliegt, ist die Konzentration an frei verfügbarem Eisen innerhalb des Wirtes häufig so niedrig, dass sie einen limitierenden Wachstumsfaktor für Mikroorganismen darstellt (Wooldridge und Williams, 1993). Deshalb spielen spezielle Mechanismen zur effektiven Eisenversorgung bei den pathogenen Bakterienarten in der Regel eine sehr bedeutende Rolle während der Wirtsbesiedlung. Für *L. monocytogenes* ist bisher bekannt, dass dieser Erreger zum einen in der Lage ist, über ein

spezifisches Transportsystem Eisencitrat direkt aus dem umgebenden Milieu aufzunehmen (Adam et al., 1990). Zum anderen verfügt *L. monocytogenes* über eine extrazelluläre Eisen(III)-Reduktase, die als Substrate verschiedene Eisen(III)verbindungen, wie z.B. Catecholamine, Siderophore anderer Mikroorganismen und sehr wahrscheinlich auch Transferrin, nutzen kann. Das entstehende zweiwertige Eisen wird anschließend über ein Eisen(II)Rezeptor- und Transportsystem in die Bakterienzellen aufgenommen (Adam et al., 1990; Deneer et al., 1995; Coulanges et al., 1997; Hartford et al., 1993). Obwohl die Eisenaufnahme bei *L. monocytogenes* biochemisch bereits gründlich analysiert worden ist, ist kaum etwas über die korrespondierenden Gene und ebenfalls kaum etwas über die Art der Eisen-Transportsysteme dieses Erregers bekannt (Brown und Holden, 2002). Bei anderen pathogenen Bakterienarten sind häufig ABC-Transportsysteme an der Eisenversorgung beteiligt (Brown und Holden, 2002). Der experimentelle Nachweis der drei substratbindenden Lipoproteine Lmo1073, Lmo0541 und Lmo2431 deutet auch bei *L. monocytogenes* auf eine wichtige Funktion der ABC-Transportsysteme bei der Eisenversorgung des Erregers hin. Daher wäre es durchaus denkbar, dass die funktionelle Beeinträchtigung dieser Transportsysteme unter den eisenlimitierten Bedingungen des intrazellulären Milieus einen sichtbaren Effekt auf die Wachstumsrate der Bakterien ausübt.

Ein weiteres Lipoprotein, dem in diesem Zusammenhang eine Bedeutung zukommen könnte, ist Lmo1847 (Alp). Alp weist eine hohe Homologie zu den Substratbindungskomponenten von Metall-ABC-Transportern bei diversen *Streptococcus* Spezies auf und wurde in der Doktorarbeit von Jessica Schaumburg detailliert analysiert. „Bei der funktionellen Analyse mit Hilfe der *alp*-Deletionsmutante konnten in Wachstums- sowie Infektionsversuchen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtypstamm gefunden werden. In Proteomanalysen konnte jedoch gezeigt werden, dass bestimmte Proteine in der Deletionsmutante stärker exprimiert werden. Einige hochregulierte Proteine (Lmo0541, Lmo1041, Lmo1738 und Lmo2431) wurden durch Homologien Funktionen als Eisen-, Molybdat- oder Aminosäure-bindender Teil weiterer ABC-Transporter zugeordnet. Da die Spezifitäten noch nicht genau untersucht worden sind, ist eine Übernahme der Funktion des ausgeschalteten Alps gut denkbar.“ (Doktorarbeit Jessica Schaumburg, GBF Braunschweig, 2003).

Nach Réglier-Poupet et al. (2003) kommt Alp zusätzlich eine Bedeutung bei der Invasion der Listerien in die Wirtszellen zu.

b. Einfluss eines speziellen Lipoproteins

Die reduzierte intrazelluläre Vermehrung der Δlgt -Mutante könnte jedoch ebenso auf die funktionelle Beeinträchtigung eines speziellen Lipoproteins, wie z.B. Lmo2219, zurückgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Homolog zu dem Posttranslokationschaperon PrsA unter der Kontrolle des Virulenzgenregulators PrfA steht und dass diesem Protein deshalb sehr wahrscheinlich eine Bedeutung in dem Infektionszyklus des Erregers zukommt. Wie bereits unter 4.2. diskutiert wurde, ist das Chaperon für die Faltung sekretierter Proteine und somit vermutlich auch für die Faltung der essentiellen Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* zuständig. Eine funktionelle Beeinträchtigung dieses Enzyms könnte daher einen Einfluss auf die Stabilität und die Funktion dieser Proteine haben, was sich wiederum in einer reduzierten Virulenz der Bakterien äußern könnte. In diesem Zusammenhang muss jedoch erwähnt werden, dass die *lgt*-Deletion keinen sichtbaren Effekt auf das Invasionsverhalten der Bakterien zeigte und dass auch bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kein deutlicher Unterschied zwischen der Aktinfilamentrekrutierung der Mutante und dem Wildtypstamm sichtbar war. Dieses deutet darauf hin, dass weder die beiden Internaline (InlA, InlB) noch ActA durch die *lgt*-Deletion in ihrer Funktion beeinträchtigt wurden. Anders könnte es allerdings bei den sekretorischen Proteinen Hly, PlcA, PlcB und Mpl aussehen. Eine Beeinträchtigung der Stabilität bzw. der Funktion dieser Proteine könnte ein verzögertes Entkommen der Bakterien aus den Phagosomen zur Folge haben. Diese Hypothese würde mit den Untersuchungen von Réglier-Poupet et al. (2003) übereinstimmen. Réglier-Poupet et al. konnten anhand einer SPaseII-Deletion bei *L. monocytogenes* Hinweise darauf finden, dass die Reifung der Lipoproteine eine Rolle bei dem Entkommen der Listerien aus dem Phagosom spielt. Die SPaseII ist für den zweiten Schritt in der Lipoproteinmodifizierung, der Abspaltung der Signalpetide, verantwortlich. Auch bei der SPaseII-Deletionsmutante konnte gegenüber dem Wildtypstamm kein Wachstumsnachteil in dem Vollmedium BHI detektiert werden, jedoch wies die Mutante ebenfalls eine reduzierte intrazelluläre Vermehrung in Makrophagen und Caco-2-Zellen auf. Réglier-Poupet et al. konnten demonstrieren, dass die verringerte intrazelluläre Wachstumsrate zum Teil mit einem verzögerten Entkommen aus dem Phagosom zusammenhängt. Ob dieses jedoch ausschließlich der Grund für die reduzierte intrazelluläre Vermehrung ist, oder ob die SPaseII-Deletionsmutante generell intrazellulär einen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtypstamm besitzt, geht nicht eindeutig aus den Untersuchungen hervor. Allerdings konnte durch diese Untersuchungen gezeigt werden, dass

sowohl der Transfer des Lipidankers als auch die Abspaltung des Signalpeptids notwendig sind, damit wichtige Lipoproteine unbeeinträchtigt ihre Funktionen ausüben können.

Réglier-Poupet et al. war es ebenfalls nicht möglich, die für diese Beobachtungen verantwortlichen Lipoproteine zu identifizieren. Neben PrsA können noch andere Lipoproteine eine Bedeutung beim Entkommen der Bakterien aus dem Phagosom besitzen. So könnte z.B. ebenfalls das putative Lipoprotein Lmo0366 von besonderer Bedeutung sein. Dieses Protein wurde im Kapitel 3.5.2. als PrfA-reguliert identifiziert, allerdings ist die Funktion dieses Proteins bisher noch nicht bekannt.

Interessanterweise wurde bereits in einer früheren Untersuchung von Borezee et al. (2000) ein Einfluss des oligopeptidbindenden Lipoproteins OppA beim Entweichen der Bakterien aus dem Phagosom postuliert.

c. Einfluss des Oligopeptid-Bindungsproteins OppA

Die Analysen des Kapitels 3.2.4. deuten darauf hin, dass bei *L. monocytogenes* vier verschiedene oligopeptidbindende Lipoproteine mit ein und demselben Membranprotein-komplex, dem OppBCDF-Transportsystem, interagieren. Eines dieser Oligopeptid-Bindungsproteine wurde zudem als PrfA-reguliert identifiziert, welches eine Beteiligung des Oligopeptidtransportsystems an dem Infektionszyklus des intrazellulären Bakteriums vermuten lässt.

Bei den Sekretomanalysen der Δlgt -Mutante fiel zunächst auf, dass alle vier für *L. monocytogenes* vorhergesagten Oligopeptid-Bindungsproteine (OppA, Lmo2196, Lmo0135, Lmo0152) in verhältnismäßig großen Mengen in dem extrazellulären Proteom der Δlgt -Mutante vorzufinden sind. Diese vier Proteine wurden in einem sehr engen pH-Bereich aufgetrennt und wiesen alle ein für Lipoproteine eher untypisch hohes Molekulargewicht (58-63 kDa) auf. Eine Analyse der Genloci der vier Oligopeptid-Bindungsproteine zeigte, dass nur bei einem dieser Lipoproteine Hinweise auf ein korrespondierendes ABC-Transportsystem zu finden sind. Ausschließlich bei dem OppA-kodierenden Gen weisen die umliegenden DNA-Abschnitte auf eine Organisation in einem Operon hin. Dieses Operon setzt sich aus fünf verschiedenen Genen zusammen. Eines dieser fünf Gene kodiert für das Oligopeptid-Bindungsprotein OppA, zwei Gene für die Permeasen OppB und OppC und zwei weitere Gene für die ATP-Bindungsproteine OppD und OppF. Zu diesem sogenannten *opp*-System gibt es sowohl in anderen grampositiven als auch in gramnegativen Bakterien

homologe Operonstrukturen (Monnet, V., 2003). Während bei *B. subtilis* neben dem *opp*-System noch ein zweites ABC-Transportsystem für Oligopeptide, das sogenannte *app*-System, vorzufinden ist (Koide und Hoch, 1994), existieren bei *L. monocytogenes* keine Hinweise auf ein weiteres vollständiges oligopeptidspezifisches ABC-Transportsystem.

Das *opp*-System scheint nicht nur das einzige vollständige oligopeptidspezifische ABC-Transportsystem von *L. monocytogenes* darzustellen, sondern es konnte zudem gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen der Hauptproteinkomplexe der listeriellen Membran handelt. Sowohl mit Hilfe der 16BAC/SDS-PAGE als auch mit Hilfe der anderen zwei zur Analyse der aufgereinigten Membranfraktion verwendeten Methoden konnten die Bestandteile des *opp*-System aufgetrennt und identifiziert werden. Mit Hilfe der BN/SDS-PAGE gelang es, mehrere Bestandteile des OppBCDF-Transportsystem im Komplex nachzuweisen. Hinweise auf die Interaktion des Membranproteinkomplexes mit einem der vier Oligopeptid-Bindungsproteine, einschließlich OppA, konnten allerdings nicht erbracht werden. Dieses könnte darauf zurückgeführt werden, dass die Assoziation zwischen den Lipoproteinen und dem Membranproteinkomplex nicht sehr stabil ist und dass daher die Lipoproteine während der nativen Auftrennung in der ersten Dimension von dem Membrankomplex getrennt werden. Es liegt zudem die Vermutung nahe, dass die Substratbindungsproteine der grampositiven Bakterien nicht die ganze Zeit über mit dem Membrankomplex assoziiert sind, sondern ähnlich wie die Substratbindungsproteine der gramnegativen Bakterien erst nach der Substratbindung eine Bindung mit dem Membranproteinkomplex eingehen. Bei den Untersuchungen eines Maltose-ABC-Transportsystems von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass bei dem Substratbindungsprotein erst durch die Konformationsänderung während der Substratbindung die Bindestellen zum Membrankomplex freigelegt werden (Chen et al., 2001). Ähnlich könnte es bei den Substratbindungsproteinen der grampositiven Bakterien aussehen, hier allerdings mit dem Unterschied, dass die Substratbindungsproteine sich nicht frei im periplasmatischen Raum bewegen, sondern über die Lipidmodifikation in der Zellmembran verankert sind. Während bereits intensive Strukturanalysen des oligopeptidbindenden Proteins OppA (vorwiegend in *S. typhimurium*) in Kombination mit verschiedenen Substraten durchgeführt worden sind (Sleigh et al., 1999; Tame et al., 2000), ist nur wenig über die Assoziation dieses Proteins mit dem Membranproteinkomplex bekannt. Deshalb ist es bisher nicht sicher, welche Sequenzregionen des OppAs und der anderen Lipoproteine eine Rolle bei der Bindung an den Membranproteinkomplex spielen. Durch den Sequenzvergleich der vier Oligopeptid-Bindungsproteine von *L. monocytogenes* konnten einige hochkonservierte Regionen zwischen

den vier Proteinsequenzen detektiert werden, die in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnten. Weiterhin fiel bei dem Sequenzvergleich auf, dass insbesondere im Bereich der vorhergesagten substratbindenden Domäne eine höhere Varianz vorzufinden ist, was wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Substratspezifität der vier Oligopeptid-Bindungsproteine zurückzuführen ist.

Die vermutete Interaktion der vier Oligopeptid-Bindungsproteine von *L. monocytogenes* und dem OppBCDF-Komplex finden insbesondere durch vergleichbare Fälle in der Gattung *Streptococcus* Bestätigung. In dem Genom von *S. pneumoniae* und *S. thermophilus* wurden neben dem Oligopeptid-Bindungsprotein AmiA zwei weitere oligopeptidbindende Lipoproteine (AliA/Ami2, AliB/Ami3) identifiziert, die nachweislich alle mit dem AmiBCDF-System interagieren (Alloing et al., 1994; Garault et al., 2002). Das *ami*-System der Gattung *Streptococcus* ist homolog zu dem *opp*-System von *L. monocytogenes*.

Auch in *E. coli* wird neben dem Homolog zu OppA das sogenannte MppA exprimiert. Dieses Oligopeptid-Bindungsprotein weist eine hohe Affinität zu Muropeptiden auf und interagiert ebenfalls nachweislich mit dem OppBCDF-Membrankomplex (Park et al., 1998). In *Enterococcus faecalis* wurden neben dem Oligopeptid-Bindungsprotein OppA die Proteine PrgZ und TraC als zusätzliche Oligopeptid-Bindungsproteine identifiziert. Diese beiden Proteine binden mit einer hohen Affinität an Sexpheromone und transportieren diese ebenfalls über das OppBCDF-System in die Zellen (Tanimoto et al., 1993; Leonard et al., 1996). Der Transport der Sexpheromone über die beiden Oligopeptid-Bindungsproteine PrgZ und TraC ist von besonderer Bedeutung für die Signalübertragung und die interzelluläre Kommunikation der Bakterien. Durch die Aufnahme der spezifischen Sexpheromone wird die Konjugation zwischen Bakterien mit unterschiedlichen Resistenzplasmiden eingeleitet.

Bei den 2D-Analysen des extrazellulären Proteoms der unterschiedlich PrfA-exprimierenden Δlgt -Stämme wurde auf der gleichen Molekulargewichtshöhe von OppA(1) ein zweiter Proteinspot detektiert, der ebenfalls als OppA identifiziert werden konnte. Dieser als OppA(2) gekennzeichnete Proteinspot wies einen deutlich sichtbaren „pI-Schift“ im Vergleich zu OppA(1) auf. Da OppA(1) in Höhe des theoretisch vorhergesagten pI-Wertes aufgetrennt wurde, liegt es nahe, dass es sich bei OppA(2) um eine posttranslational modifizierte Form des Oligopeptid-Bindungsproteins handelt.

Interessanterweise konnte die OppA(2)-Form fast ausschließlich in dem extrazellulären Proteom des $\Delta lgt/\Delta prfA$ -Stammes detektiert werden, wo sie sogar in vergleichbaren Mengen

zu der OppA (1)-Form vorzufinden ist. In dem extrazellulären Proteom des Wildtypstammes und vor allem in dem extrazellulären Proteom des konstitutiv PrfA-überexprimierenden Stammes nimmt der OppA(2)-Spot zugunsten des Opp(1)-Spots deutlich ab. Dieses zeigt, dass die An- und Abwesenheit von PrfA einen signifikanten Einfluss auf die Expression dieser beiden Proteinformen hat. Ein direkter Einfluss von PrfA auf die Modifikation von OppA ist allerdings unwahrscheinlich und so ist zu vermuten, dass PrfA indirekt durch die Regulation weiterer Proteine die Modifikation von OppA beeinflusst.

Bei den Analysen von Borezee et al. (2000) konnte anhand einer *oppA*-Insertionsmutante gezeigt werden, dass das Oligopeptid-Bindungsprotein generell eine Rolle bei der intrazellulären Vermehrung der Bakterien spielt. So wies die *oppA*-Insertionsmutante sowohl in Makrophagen *in vitro* als auch in Mäuseorganen während der frühen Infektionsphase ein reduziertes Wachstum im Vergleich zu dem Wildtypstamm auf. Die Autoren konnten ebenfalls Hinweise darauf finden, dass diese Beobachtung teilweise im Zusammenhang mit einem verzögerten Entkommen der *oppA*-Insertionsmutante aus den Phagosomen steht.

Da in Anwesenheit großer Mengen an PrfA fast ausschließlich die Opp(1)-Form vorzufinden ist, könnte spekuliert werden, dass die Opp(1)-Form während der pathogenen Lebensphase von *L. monocytogenes* eine besondere Bedeutung übernimmt. Hingegen könnte die Opp(2)-Form eine wichtige Rolle bei der apathogenen Lebensweise der Bakterien spielen und z.B. die Vermehrung des Erregers bei 0-5°C unterstützen. Borezee et al. konnten bereits einen signifikanten Einfluss des Oligopeptid-Bindungsproteins auf das Wachstum der Bakterien unter 4°C nachweisen.

Während der apathogenen Lebensphase könnte OppA(2) für eine verbesserte oder alternative Substrataufnahme verantwortlich sein. Eine Modulation der Substrataufnahme könnte sowohl eine Anpassungsreaktion an ein verändertes Nährstoffangebot darstellen, als auch in Signaltransduktionprozessen involviert sein. Eine peptidvermittelte Signaltransduktion wurde unter anderem für die Prozesse der Kompetenz, der Sporulation und der Regulation von Infektionsprozessen beschrieben (Monnet, V., 2003). Bei *B. cereus* und *B. thuringiensis* ist z.B. die Aktivierung des zentralen Virulenzregulators PlcR abhängig von der Aufnahme spezifischer Peptide (PapR), die nachweislich über ein oligopeptidspezifisches Transportsystem erfolgt (Slamti und Lereclus, 2002).

Da die OppA (2)-Form in relativ großen Mengen in der *prfA*-Deletionsmutante vorzufinden ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Modifikation funktionell für die Bakterien von Bedeutung ist. Um mehr Informationen über dieses möglicherweise spezifische Anpassungssystem an diverse Umweltbedingungen zu erhalten, wäre es zunächst notwendig,

die Art und die Position der Modifikation zu bestimmen. Auf diese Weise könnten eventuell Rückschlüsse auf die Substratspezifitäten und die Rolle des Transporters innerhalb des Infektionszyklus von *L. monocytogenes* geschlossen werden.

Zusammenfassend wurden für *L. monocytogenes* insgesamt 10 putativ am Oligopeptidtransport beteiligte Komponenten im Rahmen des Gemonsequenzierungsprojektes annotiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Strategien zur gezielten Analyse von Lipoproteinen und Membranproteinkomplexen konnten innerhalb dieser Studie tatsächlich 7 der erwarteten Komponenten experimentell identifiziert werden. Abbildung 4.1 fasst die bisherigen Ergebnisse zum listeriellen Oligopeptidtransportsystem zusammen.

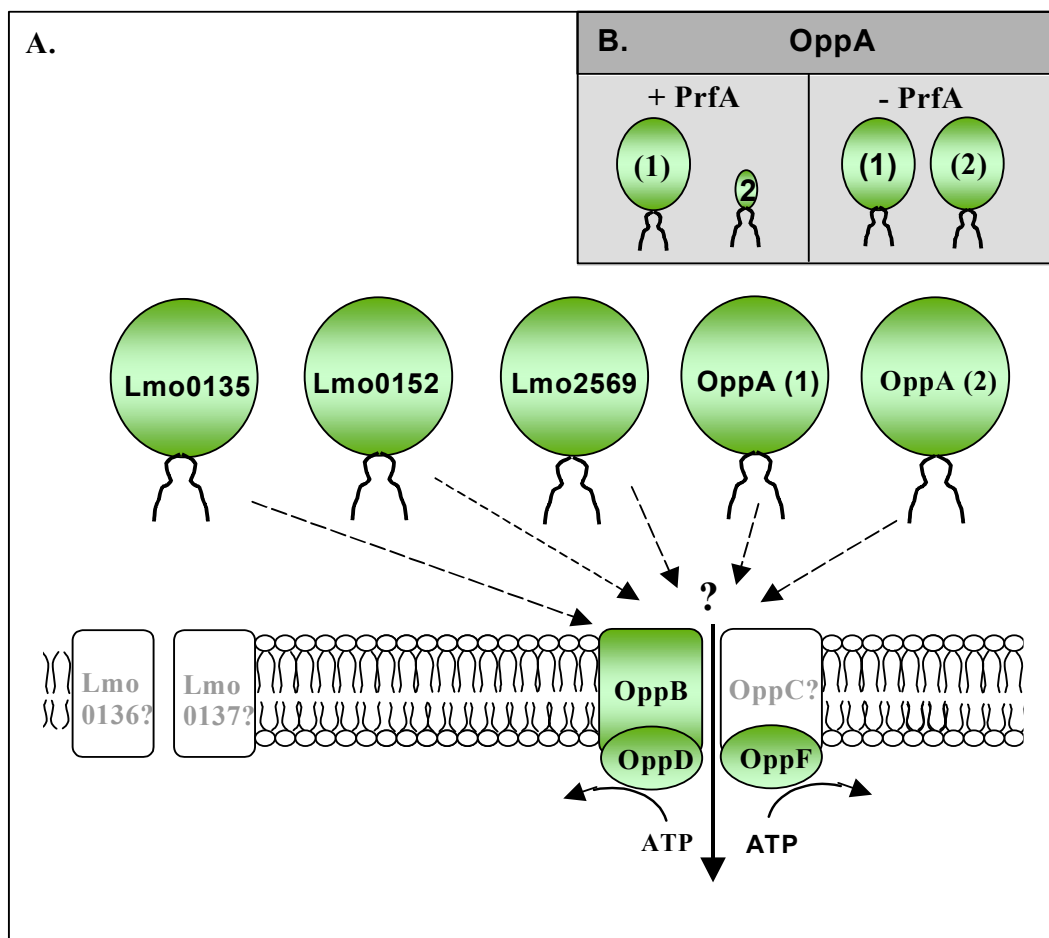


Abbildung 4.1: Die Komponenten des Oligopeptidtransportsystems bei *L. monocytogenes*. A. Die Abbildung stellt die in dem Genom von *L. monocytogenes* annotierten oligopeptidspezifischen Transportkomponenten dar. Grün unterlegt sind die Komponenten, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnten. B. Bei einem der Oligopeptid-Bindungsproteine, OppA, wurde im 2D-Gel auf der gleichen Molekulargewichtsebene eine zweite Form (Opp (2)) detektiert, die wahrscheinlich auf eine posttranslationale Modifikation zurückzuführen ist. Die Expression dieser Form ist abhängig von dem zentralen Virulenzregulator PrfA.

4.4. Hinweise auf die Prozessierung der Prälipoproteine durch die SPaseII

Der Transfer des Diacylglycerylrestes an das in der Lipobox enthaltende Cystein durch Lgt gilt bei den gramnegativen Bakterien als Voraussetzung für die Prozessierung des Signalpeptids durch die SPaseII (Tokunaga et al., 1984; Dev et al., 1984; Hussain et al., 1980). Trotz umfassender Untersuchungen bei *B. subtilis* konnten bisher keine Abweichungen zu dieser Beobachtung festgestellt werden, und so besteht auch bei den grampositiven Bakterien die allgemeine Annahme, dass die Lgt-Modifikation eine unmittelbare Voraussetzung für die SPaseII-Aktivität darstellt (Leskelä et al., 1999; Tjalsma et al., 1999a/b; Antelmann et al., 2001). Um so interessanter sind deshalb die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Hinweise, dass die hochkonservierte SPaseII bei *L. monocytogenes* die Lipoproteine auch ohne Diacylglycerylmodifikation erkennt und prozessiert.

Der erste Hinweis konnte durch die N-terminale Sequenzierung von acht freigesetzten Lipoproteinen der Δlgt -Mutante ermittelt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass bei fünf dieser Proteine das Signalpeptid direkt vor dem Cystein der Lipobox und somit an der für die SPaseII-vorhergesagten Schnittstelle gespalten wurde. Um einen weiteren Anhaltspunkt zu bekommen, ob eventuell die SPaseII für die Prozessierung dieser fünf Lipoproteine verantwortlich sein könnte, wurde die Δlgt -Mutante in Anwesenheit von Globomycin angezogen. Globomycin ist ein reversibler Peptidinhibitor, der in der Literatur als spezifischer Inhibitor der SPaseII beschrieben wird (Inukai et al., 1978; Dev et al., 1984; Sankaran et al., 1994). Durch die Anzucht der Δlgt -Mutante in Anwesenheit von Globomycin konnte die Freisetzung der Lipoproteine mit Ausnahme der zwei Lipoproteine Lmo0135 und Lmo2219 (Spot2) fast vollständig unterdrückt werden. Dieses zeigt, dass die Signalpeptidase, die für die Freisetzung der Lipoproteine bei der Δlgt -Mutante verantwortlich ist, nicht nur die Lipoproteine an der für die SPaseII-spezifischen Schnittstelle prozessiert, sondern ebenfalls durch das SPaseII-spezifische Antibiotikum Globomycin gehemmt werden kann.

Warum die Freisetzung der Lipoproteine durch die Globomycinbehandlung fast vollständig unterdrückt wird, könnte darauf zurückgeführt werden, dass die ungespalteten Signalpeptide eine ausreichende Länge besitzen, um über hydrophobe Wechselwirkungen die Lipoproteine in der Membran zurückzuhalten. Auch bei Untersuchungen von *B. subtilis* konnte bei einigen unmodifizierten Lipoproteinen gezeigt werden, dass die Signalpeptide teilweise als Membran-anker dienen können (Puochiniemi et al., 1992; Kempf et al., 1997). Fragwürdig in diesem Zusammenhang bleibt allerdings, warum die zwei Lipoproteine Lmo0135 und PrsA (Spot2) hierbei eine Ausnahme bilden. Denn trotz einer genauen Analyse der Signalsequenzen

wurden bei den beiden Proteinen keine Besonderheiten entdeckt, die dieses Phänomen erklären könnten. Die N-terminale Sequenzierung von PrsA (Spot2) weist jedoch darauf hin, dass in diesem Fall wahrscheinlich eine andere Signalpeptidase für die Spaltung des Signalpeptids verantwortlich ist. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Analyse der Δlgt -Mutante von *B. subtilis* gemacht werden. Hier konnte durch eine N-terminale Sequenzierung von insgesamt sechs freigesetzten Lipoproteinen gezeigt werden, dass das Signalpeptid in allen sechs Fällen an einer für die SPaseII untypischen Schnittstelle prozessiert worden ist (Antelmann et al., 2001). Nach Antelmann et al. könnte dieses Phänomen durch zwei verschiedene Mechanismen erklärt werden. Zum einen könnten die Prälipoproteine durch die Aktivität einer anderen Signalpeptidase prozessiert und folglich ins Medium ausgewaschen werden. Zum anderen besteht nach Antelmann et al. die Möglichkeit, dass die Prälipoproteine zunächst entweder aktiv oder passiv ans Medium abgegeben werden und erst dort durch extrazelluläre Proteasen prozessiert werden. Vorausgesetzt, dass sich der Mechanismus der Lipoproteinfreisetzung bei der Δlgt -Mutante von *B. subtilis* nicht grundlegend von dem Mechanismus bei *L. monocytogenes* unterscheidet, wäre nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit anzunehmen, dass die erste Hypothese von Antelmann et al. zutreffend ist. In diesem Fall bleibt allerdings die Frage offen, weswegen bei *B. subtilis* die Prälipoproteine durch eine andere Signalpeptidase gespalten werden, während bei *L. monocytogenes* verschiedene Hinweise darauf hindeuten, dass vorwiegend die SPaseII für die Prozessierung verantwortlich ist. Die SPaseII von *L. monocytogenes* unterscheidet sich zumindest nicht von denen der anderen Bakterienarten, sondern weist sogar eine 57,5% Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz der SPaseII von *B. subtilis* auf (Réglier-Poupet et al., 2003). Allerdings konnte durch eine Genomanalyse festgestellt werden, dass in dem Genom von *L. monocytogenes* im Gegensatz zu dem von *B. subtilis* eine weitere Gensequenz (Lmo1101) vorhanden ist, die für eine lipoproteinspezifische SPaseII kodieren könnte. Dieses putative Genprodukt unterscheidet sich nur geringfügig von der durch Réglier-Poupet et al. identifizierten SPaseII und weist zudem die von Tjalsma et al. annotierten fünf hochkonservierten Bereiche der SPaseII-Homologe auf (Tjalsma et al., 1999b; Réglier-Poupet et al., 2003). Interessanterweise fehlt zu diesem Genprodukt ebenfalls ein Ortholog in der apathogenen Spezies *L. innocua*, welches darauf hindeutet, dass die Existenz von zwei SPaseII-kodierenden Gensequenzen sehr spezifisch für *L. monocytogenes* ist. Die Rolle und Bedeutung dieses Genprodukts ist bisher noch unbekannt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie im Zusammenhang mit der Freisetzung der Lipoproteine bei der Δlgt -Mutante steht.

4.5. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit etablierten Methoden bilden die Basis für eine umfassende Analyse listerieller Membranproteine. Im Rahmen der in der Abteilung durchgeführten Diplomarbeit von Elmar Fischer wurde bereits begonnen, unter Verwendung der etablierten Methoden zur Aufreinigung der Membranfraktion und der Kombination aus SDS-PAGE und LC-MS/MS-Analyse eine weiterführende Katalogisierung und Analyse des Membransubproteoms durchzuführen. Dabei sollte insbesondere die Absicherung der identifizierten putativ PrfA-abhängigen Membranproteine im Vordergrund stehen. Zu diesem Zweck kann z.B. auf eine „real time“-PCR zurückgegriffen werden.

Bei der Analyse der Lipoproteine konnten mehrere interessante Proteine identifiziert werden, deren funktionelle Beeinträchtigung einen Einfluss auf das reduzierte intrazelluläre Wachstum der Δlgt -Mutante haben könnte. Um den Einfluss dieser Proteine auf die Pathogenität von *L. monocytogenes* zu bestimmen, bieten sich verschiedene Möglichkeiten an. Im Falle des Lipoproteins Lmo2219 wurde bereits eine Deletionsmutante in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Trinad Chakraborty (Universität Gießen) generiert. Eine nähere Charakterisierung dieser Deletionsmutante erfolgt im Rahmen einer Kooperation und könnte somit Aufschluss über die Bedeutung des Posttranslokationschaperons an der Faltung der essentiellen Virulenzfaktoren geben.

Zur Ermittlung des Einflusses spezifischer Substratbindungskomponenten auf die intrazelluläre Nährstoffaufnahme könnte zunächst ein Wachstumsvergleich unter Mangel bestimmter Nährstoffe zwischen der Δlgt -Mutante und dem EGD Wildtypstamm durchgeführt werden. Mit Hilfe der etablierten Methoden könnten in vergleichenden Expressionsanalysen die Transportkomponenten identifiziert werden, deren Expression in Abhängigkeit der jeweiligen Mangelbedingungen erhöht wird, und die somit vermutlich eine wichtige Rolle bei der spezifischen Nährstoffversorgung spielen. Von besonderem Interesse wäre dabei die Frage, ob die drei eisenspezifischen Substratkomponenten eine Rolle bei der Eisenversorgung spielen.

Im Fall des Oligopeptid-Bindungsprotein OppA wurde begonnen, Art und Position der Modifikation der OppA2-Form zu analysieren. Dieses könnte mit Hilfe einer spezifischen MS-Analyse erfolgen. Um zu abschließenden Ergebnissen zu kommen, muss jedoch eine vollständige Sequenzabdeckung des Proteins durch den Einsatz verschiedener Proteasen erzielt werden. Es ist zu erwarten, dass die Kenntnis der Art und Position der Modifikation unmittelbar über die durch PrfA modulierte Enzymfunktion Aufschluss geben wird.

Außerdem könnte geklärt werden, ob die OppA2-Form eher eine Veränderung hinsichtlich der Substratbindung aufweist oder ob die Modifikation im Zusammenhang mit einer veränderten Interaktion des OppA mit dem OppBCDF-Komplex stehen könnte. Auch eine Strukturanalyse der beiden OppA-Formen könnte Aufschluss über den Einfluss der Modifikation auf die funktionellen Domänen des Proteins geben.

Bei der Analyse der zehn ausgewählten Lipoproteine, gegen die polyklonale Antikörper entwickelt worden sind, konnte bereits für ein Protein eine PrfA-abhängige Regulation nachgewiesen werden. Die Analyse dieser Lipoproteine sollte systematisch fortgesetzt werden. Aufgrund der sensitiven Nachweismethode könnten in diesem Fall auch Regulationen im Infektionsmodell analysiert werden und somit Aufschluss über die funktionelle Bedeutung dieser Lipoproteine während des Infektionsverlaufes gewonnen werden.

5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit war die Analyse integraler Membranproteine und membranassoziierter Proteine von *L. monocytogenes*. Die Analyse der Hauptproteinkomponenten sollte insbesondere Aufschluss über die verschiedenen Transportsysteme geben, deren Expression mit der idealen Anpassungsfähigkeit des fakultativ intrazellulären Erregers an das Überleben außerhalb und innerhalb der Wirtszellen korreliert. Zu diesem Zweck wurde zu Beginn der Arbeit ein geeignetes Protokoll zur Anreicherung der Membranproteinfraktion etabliert. Die Verwendung verschiedener Verfahren führte zur Identifizierung von insgesamt 103 Proteinen der schwer zugänglichen Membranproteinfraktion, von denen einige bis zu zwölf putative Transmembrandomänen aufwiesen.

Eine Gruppe der membranassozierten Proteine, die Lipoproteine, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit im Detail analysiert. Durch die Inhibierung der Lipidmodifikation mittels der Konstruktion einer *lgt*-Deletionsmutante war es zum ersten Mal möglich, 27 Lipoproteine eines Bakteriums parallel zu identifizieren und vergleichenden Expressionsanalysen zugänglich zu machen. In Infektionsanalysen mit der Δ *lgt*-Mutante konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der lipidmodifizierten Proteine generell eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Vermehrung der Listerien spielt. Bei dem Großteil der Lipoproteine handelt es sich um Substratbindungsproteine, die bei den grampositiven Bakterien in der Regel mit ABC-Transportsystemen assoziiert sind. Durch die komplementäre Analyse der Membran- und der Lipoproteinfraktion war es letztendlich möglich, 33 Komponenten verschiedener ABC-Transportsystemen zu identifizieren. Unter anderem wurden drei Lipoproteine identifiziert, die homolog zu Substratbindungskomponenten eisenspezifischer ABC-Transportsysteme sind und somit die Basis für weitere Eisentransportanalysen bilden. Von besonderer Bedeutung scheint weiterhin das oligopeptidspezifische *opp*-Transportsystem zu sein, das als eines der dominantesten Transportsysteme von *L. monocytogenes* identifiziert werden konnte. Die ermittelten Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht nur eines sondern gleich vier verschiedene oligopeptidbindende Lipoproteine bei *L. monocytogenes* mit dem *opp*-Transportsystem interagieren. Da für eines dieser vier Lipoproteine eine Regulation durch den zentralen Virulenzgenregulator PrfA nachgewiesen werden konnte, ist zu vermuten, dass die Funktion des Oligopeptidtransportsystems modulierend auf die Pathogenität von *L. monocytogenes* Einfluss nimmt.

Durch vergleichende Expressionsanalysen unterschiedlich PrfA-exprimierender Stämme konnten sieben weitere Membranproteine identifiziert werden, die scheinbar unter der Kontrolle des positiven Virulenzregulators PrfA stehen. Für eines dieser Proteine konnte sowohl bei den Membranproteinanalysen als auch bei den Lipoproteinuntersuchungen eine PrfA-abhängige Regulation bestätigt werden. Hierbei handelt es sich um ein Homolog zu dem Posttranslokationschaperon PrsA von *B. subtilis*, das vermutlich an der extrazellulären Faltung der essentiellen Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* beteiligt ist. Der Einsatz spezifischer Antikörper führte zudem zu der Identifizierung eines Lipoproteins, das spezifisch für *L. monocytogenes* ist und dessen Expression negativ durch PrfA reguliert wird.

Nicht Ziel dieser Arbeit, jedoch ein Ergebnis von eventuell weitreichender Bedeutung stellen die Beobachtungen bezüglich der Lipidmodifikation von *L. monocytogenes* dar. So müssen die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse die Prozessierungsregeln bakterieller Lipoproteine in Frage stellen. Sowohl die N-terminale Sequenzierung als auch die Globomycinanalysen deuten darauf hin, dass entgegen der bisherigen Annahmen die SPaseII bei *L. monocytogenes* auch ohne die Lipidmodifizierung durch Lgt die Signalpeptide der Lipoproteine prozessiert.

6. Literatur

- Adams, T. J., Vartivarian, S., Cowart, R. E. (1990). Iron acquisition systems of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunology* 58, 2715-2718.
- Aliprantis, A. O., Yang, R.-B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimel, G. R., Godowski, P., Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-linked receptor-2. *Science* 285, 736-739.
- Alloing, G., De Philip, P., Claverys, J. P. (1994). Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the Gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology* 241, 44-58.
- Antelmann, H., Tjalsma, H., Voigt, B., Ohlmeier, S., Bron, S., van Dijk, J. M., Hecker, M. (2001). A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Research* 14, 1484-1502.
- Arai, M., Ikeda, M., Shimizu, T. (2003). Comprehensive analysis of transmembrane topologies in prokaryotic genomes. *Gene* 304, 77-86.
- Barnidge, D. R., Dratz, E. A., Martin, T., Bonilla, L. E. (2003). Absolute quantification of the G protein-coupled receptor rhodopsin by LC/MS/MS using proteolysis product peptides and synthetic peptide standards. *Analytical Chemistry* 75, 445-451.
- Bengtsson, J., Tjalsma, H., Rivolta, C., Hederstedt, L. (1999). Subunit II of *Bacillus subtilis* cytochrome c oxidase is a lipoprotein. *Journal of Bacteriology* 181, 685-688.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chatwal, G. S., Hammerschmidt, S. (2001). Alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology* 40, 1273-1287.
- Bernal, A., Ear, U., Kyrpides, N. (2001). Genomes online database (GOLD): a monitor of genome projects world-wide. *Nucleic Acids Research* 29, 126-127.
- Bille, J. (1990). Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. *Foodborne Listeriosis*. Elsevier, New York, N.Y., 71-74.
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical And Biophysical Methods* 6, 317-339.
- Blonder, J., Conrads, T. P., Yu, L.-R., Terunuma, A., Janini, G. M., Issaq, H. J., Vogel, J. C., Venstra, T. D. (2004). A detergent- and cyanogens bromide-free method for integral membrane proteomics: Application to Halobacterium purple membranes and the human epidermal membrane proteome. *Proteomics* 4, 31-45.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.

- Bohne, J., Sokolovic, Z., Goebel, W. (1994). Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* 11, 1141-1150.
- Borezee, E., Pellegrini, E., Berche, P. (2000). OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperatures and involved in intracellular survival. *Infection and Immunity* 68, 7069-7077.
- Braibant, M., Gilot, P., Content, J. (2000). The ATP binding cassette (ABC) transport system of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 449-467.
- Braun, L. H., Ohayon, H. Cossart, P. (1998). The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Molecular Microbiology* 27, 1077-1087.
- Braun, V., Wu, H. C. (1994). Lipoproteins, structure, function, biosynthesis and model for protein export. *New Comprehensive Biochemistry* 27, 319-341.
- Brehm, K., Ripio, M.-T., Kreft, J., Vázquez-Boland, J.-A. (1999). The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by β -glucosides. *Journal of Bacteriology* 181, 5024-5032.
- Brookes, P. S., Pinner, A., Ramachandran, A., Coward, L., Barnes, S., Kim, H., Darley-Usmar V. M. (2002). High throughput two-dimensional blue native electrophoresis; a tool for functional proteomics of mitochondria and signalling complexes. *Proteomics* 2, 969-977.
- Brown, J., Holden, D. W. (2002). Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes and Infection* 4, 1149-1156.
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., Cossart, P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *TRENDS in Microbiology* 10, 238-245.
- Camilli, A., Tilney, L. G., Portnoy, D. A. (1993). Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Molecular Microbiology* 8, 143-157.
- Cagney, G., Emili, A. (2002). De novo peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein mixtures using mass-coded abundance tagging. *Nature Biotechnology* 20, 163-170.
- Chakraborty, T., Leihmeister-Wächter, M., Domann, E., Hartl, M. Goebel, W., Nichterlein, T., Notermans, S. (1992). Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *Journal of Bacteriology* 174, 568-574.
- Chakraborty, T. (1996). The molecular mechanism of actin-based intracellular motility by *Listeria monocytogenes*. *Microbiology SEM* 12, 237-244.
- Chakraborty, A., Regnier, F. E. (2002). Global internal standard technology for comparative proteomics. *Journal of Chromatograph A* 949, 173-184.

- Chen, J. S. S., Quioco, F. A., Davidson, A. L. (2001). Trapping the transition state of an ATP-binding-cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS) 98(4), 1525-1530.
- Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquie, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J., Rabilloud, T. (1998). New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 1901-1909.
- Choe, L. H., Lee, K. H. (2000). A comparison of three commercially available isoelectric focusing units for proteome analysis: the multiphor, the IPGphor and the protean IEF cell. *Electrophoresis* 21, 993-1000.
- Collins, M.D., Wallbanks, S., Lane, D. J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M., Stackebrandt, E. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 240-246.
- Cossart, P., Mengaud, J. (1989). *Listeria monocytogenes*, a model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Molecular Microbiology Medicine* 6, 463-474.
- Cossart, P., Bierne, H. (2001). The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Current Opinion Immunology* 13, 96-103.
- Coulanges, V., Andre, P., Ziegler, O., Buchheit, L., Vidon, D. J. (1997). Utilization of iron-catecholamine complexes involving ferric reductase activity in *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunology* 65, 2778-2785.
- Denner, H. G., Healey, V., Boychuk, I. (1995). Reduction of exogenous ferric iron by a surface-associated ferric reductase of *Listeria* spp. *Microbiology* 141, 1985-1992.
- Dev, I., K., Ray, P. H. (1984). Inhibition of prolipoprotein signal peptidase by globomycin. *Journal of Biological Chemistry* 259, 11114-11120.
- D'Ozario, M., Folcarelli, S., Mariani, F., Colizzi, V., Rotilio, G., Battistoni, A. (2001). Lipid modification of the Cu, Zn superoxid dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical Journal* 359, 17-22.
- Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C., Cossart, P. (1993). Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator PrfA. *Molecular Microbiology* 9, 931-941.
- Duche, O., Trmoulet, F., Namane, A., Labadie, J. (2002) A proteomic analysis of the salt stress response of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters* 215, 183-188.
- Edman, P., Begg, G. (1967). A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry* 1, 80-91.

- Elsner, A., Kreikemeyer, B., Braun-Kiewnick, A., Spellerberg, B., Buttaró, B. A., Podbielski, A. (2002). Involvement of Lsp, a member of the LraI-lipoprotein family in *Streptococcus pyogenes*, in eukaryotic cell adhesion and internalisation. *Infection and Immunity* 70, 4859-4869.
- Faber, J. M., Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology Reviews* 55, 476-511.
- Finlay, B. B., Cossart, P. (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276, 718-725.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., Lazarow, P.B., (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* 93, 97-102.
- Fukuda, A., Matsuyama, S., Hara, T., Nakayama, J., Nagasawa, H., Tokuda, H. (2002). Aminoacylation of the N-terminal cysteine is essential for Lol-dependent release of lipoproteins from membranes but does not depend on lipoprotein sorting signals. *Journal of Biological Chemistry* 277(45), 43512-43518.
- Gahan, C. G., Hill, C. (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 50, 93-100.
- Gaillard, J.-L., Berche, P., Frehel, E., Gouin, E., Cossart, P. (1991). Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65, 1127-1141.
- Gan, K., Gupta, S.D., Sankaran, K., Wu, H.C. (1993). Isolation and characterisation of a temperatur-sensitive mutant of *Salmonella typhimurium* defective in prolipoprotein modification. *Journal of Biological Chemistry* 268, 16544-16550.
- Garault, P., Le Bars, D., Besset, C., Monnet, V. (2002). Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* 277., 32-39.
- Gauss, C., Kalkum, M., Lowe, M., Lehrach, H., (1999). Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis* 20, 575-600.
- Gellin, B. G., Broome, C.V.(1989). Listeriosis. *Journal of American Medical Association* 261, 1313-1320.
- Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W. (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 100, 6940-6945.
- Gilson, E., Alloing, G., Schmidt, T., Claverys, J. P., Dudler, R., Hofnung, M. (1988). Evidence for high affinity binding-proteins dependent transport systems in gram-positive bacteria and in Mycoplasma. *EMBO Journal* 7, 3971-3974.

- Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couve E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Dominguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian KD, Fsihi H, Garcia-del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gomez-Lopez N, Hain T, Hauf J, Jackson D, Jones LM, Kaerst U, Kreft J, Kuhn M, Kunst F, Kurapkat G, Madueno E, Maitournam A, Vicente JM, Ng E, Nedjari H, Nordsiek G, Novella S, de Pablos B, Perez-Diaz JC, Purcell R, Remmel B, Rose M, Schlueter T, Simoes N, Tierrez A, Vazquez-Boland JA, Voss H, Wehland J, Cossart P.(2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, 849-52.
- Goeffroy, C., Galliard, J.-L., Alouf, J. E., Berche, P. (1987). Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunology* 55, 1641-1646.
- Gooley, A., Packer, H. (1997). The importance of protein co- and post-translational modifications in proteome projects. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appl, R. D., Hochstrasser, D.F. (Eds), Springer, Heidelberg, 65-92.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular Cell Biology* 19, 1720-30.
- Hartford, T., O'Brian, S., Andrew, P. W., Jones, D., Roberts, I. S. (1993). Utilization of transferrin-bound iron by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters* 108, 311-318.
- Hartinger, J., Stenius, K., Högemann, D., Jahn, R. (1996). 16BAC/SDS-PAGE: A Two – Dimensional Gel Electrophoresis System for the Separation of Integral membrane Proteins. *Analytical Biochemistry* 240, 126-133.
- Hayashi, S., Wu, H. (1990). Lipoproteins in bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 22, 451-470.
- Hebraud, M., Guzzo, J. (2000). The main cold shock protein of *Listeria monocytogenes* belongs to the family of ferritin-like proteins. *FEMS Microbiology Letters* 190, 29-34.
- Herbert, B.R., Molloy, M.P., Gooley, A.A., Walsh, B.J., Bryson, W.G., Williams, K.L. (1998). Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* 19, 845-851.
- Heuberger, E.H., Veenhoff, L.M., Duurkens, R.H., Friesen, R.H., Poolman, B. (2002). Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *Journal of Molecular Biology* 317, 591-600.
- Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: From microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8, 67-113.
- Hill, R. A., Sillence M. N. (1997). Improved membrane isolation in the purification of β_2 -adrenoceptors from transgenic *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 10, 162-167.

- Hussain, M., Ichihara, S., Mizushima, S. (1980). Accumulation of glyceride- containing precursor of the outer membrane lipoprotein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* treated with globomycin. *Journal of Biological Chemistry* 255, 3707-3712.
- Inukai, M., Takeuchi, M., Shimizu, K., Arai, M.(1978). Mechanism of action of globomycin. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 31, 1203-1205.
- Ireton, K., Cossart, P. (1997). Host-pathogen interaction during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Annual Review of Genetics* 31, 113-138.
- Jenkinson, H. F. (1994). Cell surface protein receptors in oral streptococci. *FEMS Microbiology letters* 121, 133-140.
- Karas, M., Glückmann, M., Schäfer, J. (2000). Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry* 35, 1-12.
- Kempf, B., Gade, J., Bremer, E. (1997). Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *Journal of Bacteriology* 179, 6213-6220.
- Klose, J.(1999) Large-gel 2-D electrophoresis. *Methods of Molecular Biology* 112, 147-172.
- Kocks, C., Gouin, E., Rabouret, M., Berche, P. Ohayon, H., Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 68, 521-531.
- Koide, A., Hoch, J.A. (1994). Identification of a second oligopeptide transport system in *Bacillus subtilis* and determination of its role in sporulation. *Molecular Microbiology* 13, 417-426.
- Kontinen, V., Sarvas, M. (1993). The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion. *Molecular Microbiology* 8, 727-737.
- Kuchler, K. (1993). Unusual routes of protein secretion: the easy way out. *Trends in Cell Biology* 3, 421-425.
- Kyrpides, N. (1999). Genomes online database (GOLD): a monitor of genome projects world-wide. *Bioinformatics* 15, 773-774.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157,105-32.
- Lampidis, R., Gross, R, Sokolovic, Z., Goebel, W., Kreft, J. (1994). The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcriptional regulators. *Molecular Microbiology* 13, 141-151.

- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, Szustakowski J, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium.(2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409,860-921.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., Cossart, P. (1997). Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalisation. Infection and Immunology 65, 5309-5319.
- Leihmeister-Wächter, M., Domann, E., Charkraborty, T. (1992). The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. Journal of Bacteriology 174, 947-952.
- Lenz, L. L., Portnoy, D.A. (2002). Identification of a second *Listeria secA* gene associated with protein secretion and the rough phenotype. Molecular Microbiology 45, 1043-56.

- Leonard, B. A. B., Podbielski, A., Hedberg, P. J., Dunny, G. M. (1996). *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) 93, 260-264.
- Leskelä, S., Wahlström, E., Kontinen, V. P., Sarvas, M. (1999). Lipid modification of prelipoproteins is dispensable for growth but essential for efficient protein secretion in *Bacillus subtilis*: characterization of the *lgt* gene. Molecular Microbiology 31, 1075-1085.
- Lingau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., Chakraborty, T. (1995). Expression of *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and- independent mechanisms. Infection and Immunology 64, 1002-1006
- Linton, K. J., Higgins, C. F. (1998). The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. Molecular Microbiology 28, 5-13.
- Lottspeich, F. (1999). Proteom analysis: A pathway to the functional analysis of proteins. Angewandte Chemie International Edition 38, 2476-2492.
- Ma, J., Katsonouri, A., Gennis, R. B.(1997). Subunit II of the cytochrome *bo₃* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* is a lipoprotein. Biochemistry 36,11298-11303.
- MacDonald, P. (2001). Diversity in translational regulation. Current Opinion in Cell Biology 13, 326-331.
- Macfarlane, D.E., (1989). Two dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride-sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. Analytical Biochemistry 176, 457-463.
- Madigan, M. T., Martinko, M. J. Parker, J. (2001). Brock Mikrobiologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin.
- Marquis , H., Doshi, V., Portnoy, D. A. (1995) The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin o-independent escape of *Listeria monocytogenes* from primary vacuoles in human epithelial cells. Infection and immunology 63, 4531-4534.
- Marron, L., Emerson, N., Gahan, C. G., Hill, C. (1997). A mutant of *Listeria monocytogenes* LO28 unable to induce an acid tolerance response displays diminished virulence in a murine model. Applied Environmental Microbiology 63, 4945-4947.
- Mastro, R., Hall, M. (1999). Protein delipidation and precipitation by tri-n-butylphosphate, acetone, and methanol treatment for isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. Analytical Biochemistry 273, 313-315.
- Mihohanic, E., Glaser , P., Coppée, J.-Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vázquez-Boland, J., Kunst, F., Cossart, P., Buchrieser, C. (2003). Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. Molecular Microbiology 47, 1613-1625.

- Molloy, M.P. (2000). Two-dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins using immobilized pH Gradients. *Analytical Biochemistry* 280, 1-10.
- Monnet, V. (2003). Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Science* 60, 2100-2114.
- Nadon, C. A., Bowen, B. M., Wiedmann, M., Boor, K. J. (2002). Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunology* 70, 3948-3952.
- Navarre, C., Degand, H., Bennett, K. L., Crawford, J. S., Mørtz, E., Boutry, M. (2002). Subproteomics: identification of plasma membrane proteins from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteomics* 2, 1706-1714.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamid gels including isoelectric focusing with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Nougayrede, J. P., Fernandes, P. J., Donnenberg, M.S. (2003). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiology* 5, 359-372.
- O'Driscoll, B., Gahan, C. G., Hill, C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1693-1698.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 250, 4007-4021.
- Oliver, D. B., Beckwith, J. (1992). Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. *Cell* 30, 311-319.
- Pancholi, V., Fischetti, V. A. (1992). A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *Journal of Experimental Medicine* 176, 415-426.
- Park, J. T., Raychaudhuri, D., Li, H., Normark, S., Mengin-Lecreux, D. (1998). MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl-g-D-glutamyl-meso-diaminopimelate. *Journal of Bacteriology* 180, 1215-1223.
- Petit, C. M., Brown, J. R., Ingraham, K., Bryant, A.P., Holmes, D.J. (2001) Lipid modification of prelipoproteins is dispensable for growth in vitro but essential for virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* 200, 229-233.
- Phan-Thanh, L., Gormon, T. (1995). Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 16, 444-450.
- Phan-Thanh, L., Gormon, T. (1997). Stress proteins in *Listeria monocytogenes*. *Electrophoresis* 18, 1464-1471.

- Puochiniemi, R., Simonen, M., Mutttilainen, S., Himanen, J.-P., Sarvas, M. (1992). Secretion of the *Escherichia coli* outer membrane proteins OmpA and OmpF in *Bacillus subtilis* is blocked at an early intracellular step. *Molecular Microbiology* 6, 981-990.
- Quentin, Y., Finchant, G., Deniot, F.(1999). Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *Journal of Molecular Biology* 287, 467-484.
- Rabilloud, T., Strub, J. M., Luche, S., van Dorsselaer, A., Lunardi, J. (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1, 699-704.
- Réglier-Poupet, H., Frehel, C., Beretti, J.-L., Berche, P., Charbit, A., Raynaud, C. (2003). Maturation of lipoproteins by Typ II signal peptidase is required for phagosomal escape of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 49469-49477.
- Réglier-Poupet, H., Frehel, C., Dubail, I., Beretti, J.L., Berche, P., Charbit, A., Raynaud, C. (2003). Maturation of lipoproteins by type II signal peptidase is required for phagosomal escape of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 49469-49477.
- Renzoni, A., Cossart, P., Dramsi, S.(1999). PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. *Molecular Microbiology* 34, 552-561.
- Righetti, P.G. (1990). Immobilised pH gradients. Theory and Methodology. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- Rocourt, J., Brosch, R. (1992). Human listeriosis 1990. Document WHO/HPP/FOS/92.4. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Rosenkrands, I., Weldingh, K., Jacobsen, S., Hansen, C.V., Florio, W., Gianetri, I., Andersen, P. (2000). Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis* 21, 935-948.
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J.H., Cunliffe, W. J., Baumberg, S., Wooton, J. C. (1990). Inducible erythromycin resistance in Staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport supergene family. *Molecular Microbiology* 4, 1207-1214.
- Ryser, E.T. (1999). Foodborne listeriosis. *Listeria, Listeriosis, and food safety*, 2nd ed Marcel Dekker Inc., New York, N.Y..
- Sallen, B.A., Rajoharison, S.M., Dresverenne, S., Quinn, S. Mabilat, C. (1996). Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* Species. *International Journal Systematic Bacteriology* 46, 669-674.
- Sanderson, S., Campbell, D. J., Shastri, N.(1995). Identification of a CD4⁺T cell-stimulating antigen of pathogenic bacteria by expression cloning. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1751-1757.
- Sankaran, K., Wu, H. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 19701-19706.

- Santoni, V., Molloy, M., Rabilloud, T. (2000). Membran proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* 21, 1054-1070.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199, 223-231.
- Schaumburg, J., Diekmann, O., Hagendorff, P., Bergmann, S., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Jänsch, L., Wehland, J., Kärst, U. (2004). The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. Angenommen bei *Proteomics*. 93, 2004.
- Schaumburg, J. (2003). Identifizierung und Charakterisierung von Oberflächenproteinen des Gram-positiven Bakteriums *Listeria monocytogenes*. Dissertation, GBF/Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
- Schuchat, A., Swaminathan, B., Broome, C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 169-183.
- Simpson, R. J. Connolly, L. M., Eddes, J. S., Pereira, J. J., Moritz, R. L., Reid, G. E. (2000). Proteomic analysis of the human colon carcinoma cell line (LIM 1215): Development of a membrane protein database. *Electrophoresis* 21, 1707-1732.
- Slamti, L., Lereclus, D. (2002). A cell-cell signalling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO Journal* 21, 4550-4559.
- Sleight, S. H., Seavers, P.R., Wilkinson, A. J., Ladbury, J. E., Tame, J. R. H. (1999). Crystallographic and calorimetric analysis of peptide binding to OppA protein. *Journal of Molecular Biology* 291, 393-415.
- Solocovic, Z., Fuchs, A., Wuenscher, M., Goebel, W. (1990). Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunology* 58, 3582-3587.
- Stewart, I. I., Thomson, T., Figeys, D. (2001). Rapid Communication of Mass Spectrometry 15, 2456-2465.
- Sugai, M., Wu, H. C. (1992). Export of the outer membrane lipoprotein is defective in secD, secE and secF mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 174, 2511-2516.
- Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Kung, C. (1997). Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Annual Review Physiology* 59, 633-657.
- O' Sullivan, E., Condon, S. (1999). Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H⁺-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology* 65, 2287-2293.
- Sutcliffe, I. C., Russel, R. R. B., (1995). Lipoproteins of Gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 177, 1123-1128.
- Sutcliffe, I. C., Harrington, D. J. (2002). Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology* 148, 2065-2077.

- Tame, J. R. H., Murshudov, G., N., Dodson, E. J., Neil, T. K., Dodson, G. G., Higgins C. F., Wilkinson, A. J. (1994). The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. *Science* 264, 1578-1581.
- Tame, J. R. H. (2000). Ab initio phasing of a 4189-atom protein structure at 1.2 Å resolution *Acta Crystallographica D* 56, 1554-1559.
- Tanimoto, K., An, F. Y., Clewell, D. B. (1993). Characterization of the *traC* determinant of the *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmid pAD1: binding of the sex pheromone. *Journal of Bacteriology* 175, 5260-5264.
- Tilney, L. G., Portnoy, D. A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *Journal of Cell Biology* 109, 1597-1608.
- Tjalsma, H., Kontinen, V. P., Prágai, Z., Wu, H., Meima, R., Venema, G., Bron, S., Sarvas, M., van Dijl, J. M. (1999a). The role of lipoprotein processing by signal peptidase II in the Gram-positive eubacterium *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 1698-1707.
- Tjalsma, H., Zanen, G., Venema, G., Bron, S., van Dijl, J. M. (1999b). The potential active site of the lipoprotein-specific (Type II) signal peptidase of *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 28191-28197.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D.H., Bron, S., Van Dijl, J. M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 515-547.
- Tokunaga, M., Loranger, J. M., Wu, H. C. (1984). Lipoprotein modification and processing enzymes in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 259, 3825-3830.
- Vázquez-Boland, J., Huhn, M., Berche, P., Charkraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001a). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 584-640.
- Vázquez-Boland, J., Dominguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., Goebel, W. (2001b). Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and Infection* 3, 571-584.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor, Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina,

- N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Rombold, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 3004-3051.
- von Heijne, G. (1989). The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein Engineering* 2, 531-534.
- Washburn, M. P., Wolters, D., Yates, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* 19, 242-247.
- Wooldridge, K. G., Williams, P.H.(1993). Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 325-38.
- Wu, C. C., Yates, R. J. (2003). The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nature Biotechnology* 21, 262-267.
- Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K.E., Yates, J.R. (2003). A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nature Biotechnology* 21, 532-538.
- Yamagata, H., Ippolito, C., Inukai, M., Inouye, M. (1982). Temperature-sensitive processing of outer membrane lipoprotein is an *Escherichia coli* mutant. *Journal of Bacteriology* 152,1163-1168.
- Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P.A. (2001). Proteolytic ¹⁸O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Analytical Chemistry* 73, 2836-2842.
- Zhao, Y., Zhang, W., White, M.A., Zhao, Y. (2003). Capillary high-performance liquid chromatography/mass spectrometric analysis of proteins from affinity-purified plasma membrane. *Analytical Chemistry* 75, 3751-3757.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland, der mir die Möglichkeit gab, die Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen, und der das Referat dieser Dissertation übernommen hat. Ebenso danke ich Dr. Lothar Jänsch für die Betreuung dieser Arbeit und für die hilfreichen Diskussionen, die dem Projekt stets neue Impulse verliehen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Uwe Kärst bedanken, der für technische Fragen und für Fragen bezüglich der Annotierung stets hilfreich und besonders flink zur Verfügung stand. Für die nette Zusammenarbeit und die hilfreiche Unterstützung möchte ich mich bei der gesamten Gruppe der Proteomiker bedanken. Besonderen Dank gilt hierbei Dr. Dirk Wehmhöner und Dr. Jessica Schaumburg, die mir bei meinen anfänglichen Versuchen eine große Hilfe waren und die in den drei Jahren zu guten Freunden geworden sind. Hervorheben möchte ich ebenfalls Dr. Sandra Pilawa, die mir viel Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragen gegeben hat, aber auch stets ein Ohr für meine Sorgen hatte und immer mit aufmunternden Worten bereitstand. Außerdem gilt mein besonderer Dank Dr. Josef Wissing, der mir die verschiedensten Techniken beigebracht hat und dessen Wissen und Erfahrungen mir bei vielen Problemen weitergeholfen haben. Bei Reiner Munder, Kirsten Minkhart, Andrea Harms und Jaqueline Majewski möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bedanken. Ebenfalls vielen Dank an Anja Klutzny, die mir im Rahmen ihres Praktikums bei der Zoomgelanalyse geholfen hat und der ich noch viel Erfolg bei ihrem weiteren Werdegang wünsche.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Abteilung Zellbiologie in der GBF. Insbesondere möchte ich mich bei Petra Hagendorff danken, die mir bei den molekularbiologischen Experimenten eine große Hilfe war, aber auch bei anderen Problemen besonders freundlich und hilfsbereit zur Seite stand. Bei Dr. Sascha Pust möchte ich mich für die Einführung in die zellbiologischen Techniken und den Spass in dieser Zeit bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Rita Getzlaff für die N-terminalen Sequenzierungen, der Arbeitsgruppe MERCK für die Herstellung der Peptide und Dr. Inukai (Sankyo, Co., Ltd, Tokyo) für die kostenlose Bereitstellung des Globomycins.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates dieser Dissertation bedanken.

Vielen Dank meiner Familie und meinen Freunden!

8. Anhang

Tabelle 8.1: Identifizierte Proteine aus den aufgereinigten Membranfraktionen von *L. monocytogenes*. In der Spalte (**Kat.**) ist die Einteilung der Proteine nach Glaser und Kollegen (2001) in funktionelle Kategorien angegeben. Die Beschreibung der Kategorien ist in der Tabelle 4.1 zu finden. Die Vorhersage von Signalpeptiden (**SP**) wurde mit Hilfe von SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) durchgeführt. Der „GRAVY“-Wert wurde mit Hilfe von ProtParam (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/protparam.html>) ermittelt und die Anzahl der Transmembrandomänen (**TM**) richtet sich nach den Angaben von Arai und Kollegen (2002). Die Proteine wurden fünf verschiedenen Gruppen zugeordnet (Gruppe 1 = integrale Membranproteine; Gruppe 2 = membranassoziierte Proteine; Gruppe 3 = Proteine mit Signalpeptiden; Gruppe 4 = Proteine unbekannter Funktion; Gruppe 5 = mögliche Verunreinigungen).

Gruppe 1: integrale Membranproteine

Gen	Funktion	Kat.	SP	GRAVY	TM
Lmo0052	Homolog zu <i>B. subtilis</i> YybT Protein	5.2	ja	-0,138	1
<i>ftsH</i>	Homolog zu Zellteilungsprotein FtsH	1.7	ja	-0,367	2
Lmo0292	Homolog zu Hitzeschockprotein HtrA, Serineprotease	4.1	nein	-0,457	1
Lmo0392	Homolog zu <i>B. subtilis</i> YqfA Protein	5.2	ja	0,158	1
Lmo0618	Homolog zu Kinasen	3.8	nein	-0,062	3
Lmo0641	Homolog zu schwermetalltransportierender ATPase	1.2	ja	0,315	6
Lmo0653	Unbekannt	5.2	nein	0,459	5
Lmo0791	Unbekannt	5.2	ja	-0,379	1
Lmo0841	Homolog zu Kationen(Calcium)-transportierender ATPase	1.2	nein	0,166	8
<i>gbuB</i>	Homolog zu Permease (Glycinbetain-ABC-Transporter)	1.2	nein	0,832	6
<i>pbpA</i>	Homolog zu Penizillin-Bindungsprotein 2A	1.1	ja	-0,644	1
Lmo1399	Unbekannt	5.2	ja	-0,453	1
Lmo1422	Homolog zu Permease (Glycinbetain/Carnitin/Cholin-ABC-Transporter)	1.2	nein	0,192	6
Lmo0962	Epitop LemA	5.2	nein	-0,125	1
<i>dltD</i>	D-Alaninveresterung von Lipoteichonsäuren	1.1	ja	-0,624	1
<i>pbp</i>	Homolog zu Penicillin-Bindungsprotein	1.1	ja	-0,495	1
Lmo1495	Unbekannt	5.2	ja	-0,886	1
Lmo1527	Homolog zu SecDF	1.6	ja	0,355	12
Lmo1602	Unbekannt	5.2	ja	0,158	1
Lmo1651	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	1.2	nein	0,153	5
Lmo1740	Homolog zu Permeaseprotein (Glutamin-ABC-Transporter)	1.2	ja	0,941	4
Lmo1851	Homolog zu Carboxylterminus-prozessierende Proteinase	2.2	ja	-0,401	1
Lmo1898	Unbekannt	5.2	nein	-0,576	1
Lmo1919	Unbekannt	5.2	nein	0,531	4
Lmo1941	Unbekannt	5.2	nein	-0,773	1
<i>mscL</i>	Homolog zu mechanosensitiver Kanal	4.1	nein	0,602	2
Lmo2051	Unbekannt, geringe Ähnlichkeit zu Proteasen	2.2	ja	-0,375	1
Lmo2115	Unknown, similar to ABC-Transporter (Permease)	1.2	nein	0,438	10
Lmo2120	Unbekannt	5.2	nein	0,241	3
<i>fruA</i>	Homolog zu Phosphotransferasesystem (PTS) fruktosespezifisches Enzym IIABC Komponente	1.2	nein	0,455	10
Lmo2229	Homolog zu Penicillin-Bindungsprotein	1.1	ja	-0,375	1
<i>mreC</i>	Homolog zu zellformbestimmendes Protein MreC	1.1	ja	-0,311	1
Lmo2360	Unbekannt	5.2	ja	0,047	6
<i>atpF</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (b-Kette)	1.4	nein	-0,408	1
Lmo2371	Homolog zu Permease (ABC-Transportsystem)	1.2	ja	0,351	4

Gen	Funktion	Kat.	SP	GRAVY	TM
Lmo2463	Unbekannt	1.2	nein	0,371	12
Lmo2638	Homolog zu NADH-Dehydrogenase	1.4	nein	-0,096	4
Lmo2718	Homolog zu Cytochrome-D Ubiquinoloxidaseuntereinheit I	1.4	nein	0,417	9
Lmo2757	Homolog zu ATP-abhängige DNA Helikase	3.3	nein	-0,275	1

Gruppe 2: Membranassoziierte Proteine

Gen	Funktion	Kat.	SP	GRAVY	TM
Lmo0096	Homolog zu PTS System, mannosespezifisch, Faktor IIAB	1.2	nein	-0,123	-
Lmo0135	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	1.2	ja	-0,487	-
Lmo0152	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	1.2	ja	-0,565	-
Lmo0153	Homolog zu Substratbindungsprotein (Zn(II) ABC-Transporter)	1.2	ja	-0,534	-
Lmo0355	Homolog zu Flavocytochrom-C-Fumaratreduktasekette A	1.4	ja	-0,489	-
Lmo0366	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	1.2	ja	-0,538	-
Lmo0541	Homolog zu Substratbindungsprotein (Eisen-ABC-Transporter)	1.2	ja	-0,447	-
<i>gbuA</i>	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glycinbetain -ABC-Transporter)	1.2	nein	-0,199	-
<i>tcsA</i>	T-Zell stimulierendes Antigen, TesA	1.2	ja	-0,461	-
Lmo1068	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	6	ja	-0,666	-
Lmo1389	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Zucker-ABC-Transporter)	1.2	nein	-0,181	-
Lmo1421	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glycinbetain/Carnitin/Cholin-ABC-Transporter)	1.2	nein	-0,226	-
<i>opuCA</i>	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glycinbetain/Carnitin/Cholin-ABC-Transporter)	1.2	nein	-0,311	-
<i>opuCC</i>	Homolog zu Substratbindungsprotein (Glycinbetain/Carnitin/Cholin-ABC-Transporter)	1.2	ja	-0,377	-
Lmo1594	Homolog zu <i>B. subtilis</i> EzrA Protein	1.7	nein	-0,615	-
Lmo1636	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	1.2	nein	0,04	-
Lmo1649	Unbekannt	5.2	ja	-0,363	-
Lmo1738	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glutamin-ABC-Transporter)	1.2	ja	-0,524	-
Lmo1739	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Glutamin-ABC-Transporter)	1.2	nein	-0,041	-
Lmo1806	Homolog zu Acyl-Carrier Protein	2.4	nein	0,009	-
Lmo1847	Substratbindungsprotein (Metallionen-ABC-Transporter)	1.2	ja	-0,412	-
Lmo1849	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Metallkationen-ABC-Transporter)	1.2	nein	0,073	-
Lmo2089	Homolog zu Lipasen	2.4	ja	-0,154	-
Lmo2114	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	1.2	nein	-0,224	-
Lmo2192	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Oligopeptid-ABC-Transporter)	1.2	nein	-0,496	-
Lmo2193	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Oligopeptid-ABC-Transporter)	1.2	nein	-0,185	-
Lmo2196/ <i>oppA</i>	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter), OppA	1.2	ja	-0,694	-
Lmo2219	Homolog zu Posttranslokationschaperon PrsA von <i>B. subtilis</i>	1.6	ja	-0,789	-
Lmo2372	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	1.2	nein	-0,126	-
Lmo2569	Homolog zu Dipeptide-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	1.2	ja	0,589	-
Lmo2580	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	1.2	nein	-0,127	-
Lmo2637	Unbekannt, homolog zu konservierten Lipoproteinen	1.8	ja	-0,781	-
<i>atpA</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (alpha Kette)	1.4	nein	-0,114	-
<i>atpD</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (beta Kette)	1.4	nein	-0,135	-
<i>atpG</i>	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (gamma Kette)	1.4	nein	-0,255	-
<i>ftsE</i>	Homolog zu Zellteilungs-ATP-Bindungsprotein FtsE	1.7	nein	-0,278	-
<i>ftsZ</i>	Homolog zu Zellteilungsprotein FtsZ	1.7	nein	-0,234	-
<i>ftsA</i>	Homolog zu Zellteilungsprotein FtsA	1.7	nein	-0,062	-

Gruppe 3: Proteine mit Signalpeptiden

Gen	Funktion	Kat.	SP	GRAVY	TM
<i>hly</i>	Listeriolysin	4.5	ja	-0,47	-
Lmo0953	Unbekannt	6	ja	-0,237	-
Lmo1529	Unbekannt	5.2	ja	0,106	-

Gruppe 4: Proteine unbekannter Funktion

Gen	Funktion	Kat.	SP	GRAVY	TM
Lmo0304	Unbekannt	5.2	nein	-0,618	-
Lmo1125	Unbekannt	5.2	nein	-0,303	-
Lmo1468	Unbekannt	5.2	nein	-0,517	-
Lmo1580	Unbekannt	5.2	nein	-0,192	-
Lmo1597	Unbekannt	6	nein	-0,5	-
Lmo1888	Unbekannt	5.2	nein	-0,645	-

Gruppe 5: mögliche Verunreinigungen

Gen	Funktion	Kat.	SP	GRAVY	TM
<i>gyrA</i>	DNA Gyraseuntereinheit A	3.4	nein	-0,34	-
<i>purA</i>	Homolog zu Adenylsuccinatsynthetase	2.3	nein	-0,246	-
Lmo0493	Homolog zu Acylase	4.2	nein	-0,427	-
Lmo0739	Homolog zu 6-Phospho-beta-Glukosidase	2.1.1.	nein	-0,577	-
<i>pdhD</i>	Homolog zu Dihydrolipoamiddehydrogenase, E3 Untereinheit des Pyruvatdehydrogenasekomplexes	2.1.2	nein	-0,035	-
<i>tig</i>	Triggerfaktor (Prolyl-Isomerase)	3.9	nein	-0,535	-
<i>recA</i>	Rekombinantes Protein RecA	3.3	nein	-0,336	-
<i>dnaK</i>	DnaK, Chaperon	3.9	nein	-0,430	-
Lmo1601	Homolog zu generellen Stressproteinen	4.1	nein	-0,689	-
<i>ansB</i>	Homolog zu Asparaginsynthetase	3.7.2	nein	-0,433	-
Lmo1734	Homolog zu Glutamatsynthase	2.2	nein	-0,271	-
<i>purE</i>	Phosphoribosylaminoimidazolcarboxylase I	2.3	nein	0,235	-
<i>groEL</i>	GroEL Chaperon	3.9	nein	-0,066	-
<i>tufA</i>	Homolog zu Translationselongationsfaktor EF-Tu	3.7.4	nein	-0,272	-
<i>gap</i>	Homolog zu Glycerinaldehyd- 3-phosphat-Dehydrogenase	2.1.2	nein	-0,115	-
Lmo2154	Homolog zu Ribonucleotid-diphosphat-Reduktase, beta Untereinheit	2.3	nein	-0,42	-
<i>ccpA</i>	Katabolit-Kontroll Protein A	3.5.2	nein	-0,208	-

Tabelle 8.2: Aktualisierte Annotierung der 68 putativen Lipoproteine von *L. monocytogenes*. In der Spalte „*L.i.*“ sind die orthologen Gene der apathogenen Spezies *L. innocua* angegeben. Die Vorhersage einer möglichen **PrfA-Box** richtet sich nach den Angaben von Glaser und Kollegen (2001) und die Anzahl der Transmembrandomänen (**TM**) korrespondiert zu den Angaben von Arai und Kollegen (2002). In der Spalte (**MG**) ist das theoretische Molekulargewicht in kDa angegeben und die Spalte (**pI**) werden die theoretischen isoelektrischen Punkte gezeigt.

Gen	Funktion	<i>L.i.</i>	PrfA-Box	TM	MG	pI
<i>goxA</i>	AA3-600 Quinoloxidase Untereinheit II	lin0013	nein	2	42	6,4
Lmo0047	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin0040	nein	-	23	4,2
Lmo0135	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	lin0182	nein	-	58	4,8
Lmo0152	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	lin0190	nein	-	62	5,8
Lmo0153	Homolog zu Substratbindungsprotein (Zn(II) ABC-Transporter)	lin0191	nein	-	35	4,7
Lmo0181	Homolog zu Substratbindungsprotein (Zucker- ABC-Transporter)	lin0220	nein	-	47	4,3
Lmo0207	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin0239	nein	-	17	5
Lmo0255	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	-	nein	-	18	5,4
Lmo0285	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin0313	nein	-	30	4,8
Lmo0303	Unbekannt, lysinreiches Protein	lin0331	nein	-	20	5,5
Lmo0324	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin0349	nein	-	18	4,9
Lmo0355	Homolog zu Flavocytochrom-C-Fumaratreduktasekette A	lin0374	nein	-	54	5,7
Lmo0366	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin0385	nein	-	43	4,5
Lmo0460	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	-	nein	-	77	4,1
Lmo0510	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin0510	nein	-	22	5
Lmo0517	Homolog zu Phosphoglyceratmutase	lin0517	nein	-	30	5,5
Lmo0541	Homolog zu Substratbindungsprotein (Eisen-ABC-Transporter)	lin0545	nein	-	34	5,5
Lmo0617	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin0626	nein	-	18	4,8
Lmo0768	Homolog zu Substratbindungsprotein (Zucker- ABC-Transporter)	lin0762	nein	-	47	4,6
Lmo0791	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin0784	nein	1	24	4,4
Lmo0821	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin0817	nein	1	25	9,2
Lmo0859	Homolog zu Substratbindungsprotein (Zucker- ABC-Transporter)	lin0852	nein	-	49	4,4
Lmo0945	Homolog zu dem C-terminalen Teil des ComEC Protein und dem ComEA-Protein von <i>B. subtilis</i>	lin0944	nein	-	41	4,6
Lmo0953	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin0952	nein	-	81	4,4
<i>gbuC</i>	Homolog zu Substratbindungsprotein (Glycinbetain -ABC-Transporter)	lin1015	nein	-	33	4,8
Lmo1041	Homolog zu Substratbindungsprotein (Molybdat -ABC-Transporter)	lin1033	nein	-	28	4,8
Lmo1068	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin1056	nein	-	30	5,9
Lmo1073	Homolog zu Substratbindungsprotein (Metall -ABC-Transporter)	lin1061	nein	-	33	4,9
Lmo1265	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin1304	nein	-	25	4
Lmo1340	Homolog zu YqgU Protein von <i>B. subtilis</i>	lin1377	ja	-	42	4,9
Lmo1379	Homolog zu SpoIIJ Protein von <i>B. subtilis</i>	lin1416	nein	5	31	9,63
<i>tcsA</i>	T-Zell stimulierendes Antigen, TcsA	lin1425	nein	-	38	4,8
<i>opuCC</i>	Homolog zu Substratbindungsprotein (Glycinbetain/Carnitin/Cholin-ABC-Transporter)	lin1465	nein	-	35	7
Lmo1444	Unbekannt, homolog zu Posttranslokationschaperon PrsA von <i>B. subtilis</i>	lin1482	nein	1	33	4,9
Lmo1649	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin1689	nein	-	18	4,4
Lmo1653	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin1693	nein	-	23	4

Gen	Funktion	L.i.	PrfA-Box	TM	MG	pI
Lmo1671	Homolog zu Substratbindungsprotein (ABC-Transporter) und Adhäsionsprotein	lin1779	nein	-	36	4,7
Lmo1730	Homolog zu Substratbindungsprotein (Zucker -ABC-Transporter)	lin1841	ja	-	46	4,7
Lmo1738	Homolog zu Substratbindungsprotein (Aminosäuren -ABC-Transporter)	lin1849	nein	-	31	4,8
Lmo1757	Homolog zu Lipoproteinen	lin1869	nein	-	41	5
Lmo1800	Homolog zu Protein-Tyrosinphosphatasen	lin1914	nein	-	33	5,8
Lmo1847	Homolog zu Substratbindungsprotein (Metall -ABC-Transporter)	lin1961	ja	-	34	5,3
Lmo1903	Homolog zu Thioredoxin	lin2017	nein	-	18	8
Lmo1959	Homolog zu Ferrichrom-Bindungsprotein	lin2073	nein	-	35	4,8
Lmo2007	Unbekannt, schwache Ähnlichkeit zu Zucker-Bindungsprotein	lin2115	nein	-	55	4,8
Lmo2079	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin2185	nein	-	42	4,5
Lmo2080	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin2186	nein	1	13	4,6
Lmo2125	Homolog zu Substratbindungsprotein (Maltose/Maltodextrin -ABC-Transporter)	lin2230	ja	1	46	4,9
Lmo2184	Homolog zu Substratbindungsprotein (Ferrichrom-ABC-Transporter)	lin2288	nein	1	32	4,9
Lmo2196 <i>oppA</i>	Homolog zu Oligopeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter), OppA	lin2300	nein	-	63	5,1
Lmo2219	Homolog zu Posttranslokationschaperon PrsA von <i>B. subtilis</i>	lin2322	ja	-	32	5,6
Lmo2331	Homolog zu gp32\Bacteriophage A118 Protein	lin1232	nein	-	25	4,6
Lmo2349	Homolog zu Substratbindungsprotein (Aminosäure-ABC-Transporter)	lin2443	ja	-	30	8,6
Lmo2416	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin2511	nein	-	40	6,3
Lmo2417	Homolog zu Substratbindungsprotein (ABC-Transporter)	lin2512	nein	-	31	5,1
Lmo2431	Homolog zu Substratbindungsprotein (Ferrichrom-ABC-Transporter)	lin2525	nein	-	34	5
Lmo2446	Homolog zu Glykosidasen	lin2540	ja	1	12	4
Lmo2499	Homolog zu Substratbindungsprotein (Phosphat-ABC-Transporter)	lin2642	nein	-	32	6
Lmo2569	Homolog zu Oligopeptid/Dipeptid-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	lin2714	nein	-	61	5,4
Lmo2578	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin2722	nein	-	32	4,9
Lmo2594	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	-	nein	-	14	5
Lmo2595	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	-	nein	-	32	4,1
Lmo2636	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin2785	nein	-	40	5,1
Lmo2637	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin2786	nein	-	33	6,6
Lmo2642	Unbekannt, homolog zu Lipoproteinen	lin2791	nein	-	50	4,8
Lmo2812	Homolog zu D-Alanyl-D-Alanine Carboxypeptidase	lin2944	nein	-	30	4,6
Lmo2839	Homolog zu Substratbindungsprotein (Zucker-ABC-Transporter)	lin2972	nein	-	47	4,6
Lmo2854	Homolog zu SpoIIJ Protein von <i>B. subtilis</i>	lin2986	nein	7	32	10,5

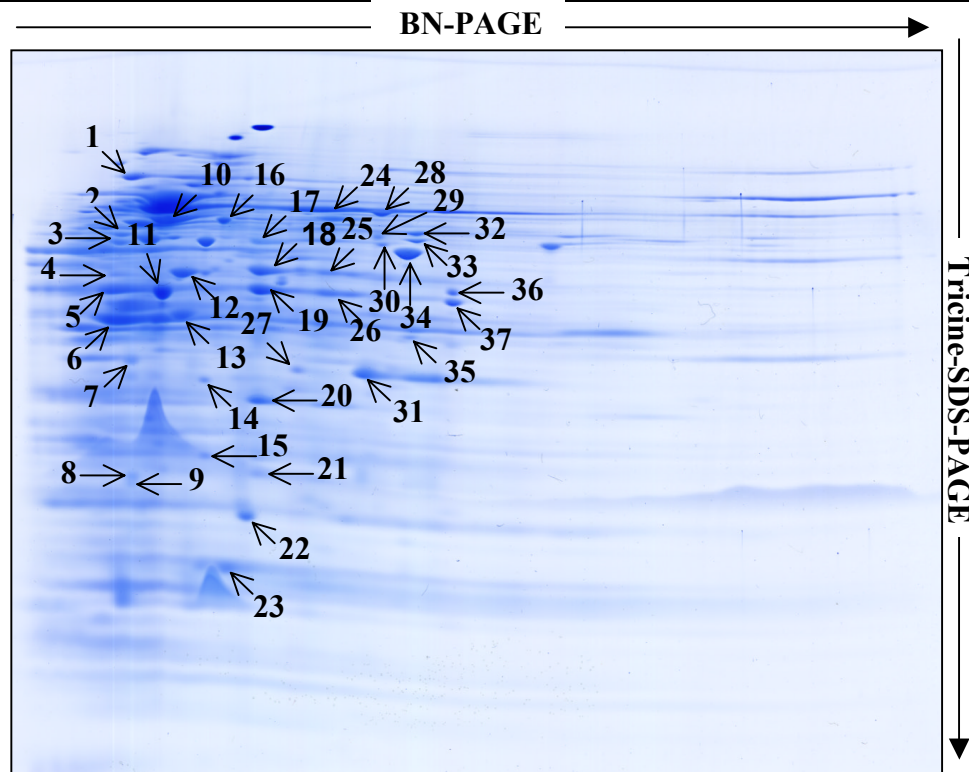
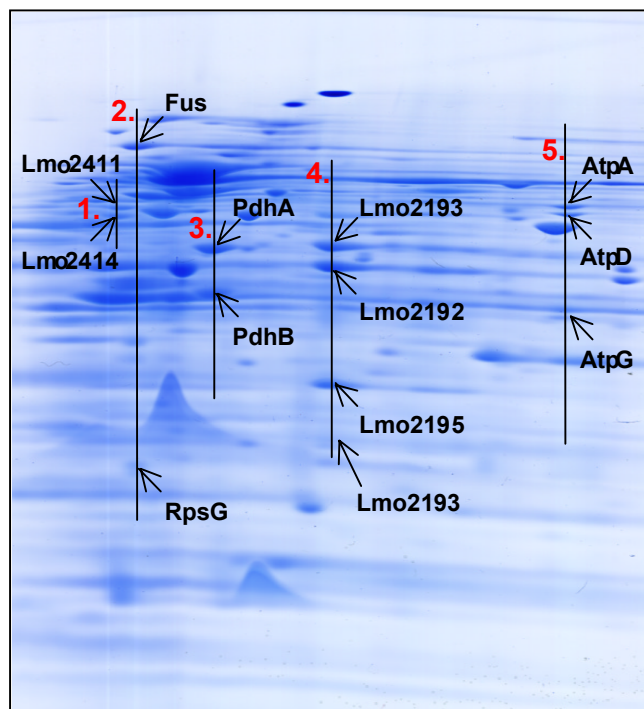


Abbildung 8.1: A. Zweidimensionale Auftrennung der Membranproteine von *L. monocytogenes* mittels BN/SDS-PAGE. Proteine bzw. Proteinkomplexe wurden unter nativen Bedingungen aus unaufgereinigten Zellmembranen isoliert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Visualisierung der Proteine mit kolloidalem Coomassie wurden die markierten Proteinspots mittels MS-Analyse identifiziert. Die identifizierten Proteine sind in der Tabelle 8.3 zusammengestellt.



1. Operon *lmo2411-lmo2415*

kodiert für zwei unbekannte Proteine (Lmo2411, Lmo2412), zwei putative Amino-transferasen (Lmo2413, Lmo2414) und ein ATP-Bindungsprotein

2. Operon *lmo2653-2658*

kodiert für zwei Elongationsfaktoren (EF-tu und Fus), zwei ribosomale Proteine (RpsG und RpsL) sowie eine dGTP-Triphospho-hydrolase (lmo2657) und eine N-Acetyl-transferase (Lmo2658).

3. Operon *lmo1052-lmo1055*

kodiert für die Bestandteile der Pyruvat-dehydrogenase (PdhA, PdhB, PdhC, PdhD)

4. Operon *lmo2192-lmo2196*

kodiert für ein ABC-Transportsystem mit zwei Proteasen (Lmo2195, Lmo2194), zwei ATP-Bindungsproteinen (Lmo2193, Lmo2192) und einem Substratbindungsprotein (Lmo2196)

5. Operon *lmo2528-lmo2536*

kodiert für die Bestandteile des ATP-Synthase-Komplexes (AtpC, AtpD, AtpG, AtpA, AtpH, AtpF, AtpE, AtpB, AtpI)

Abbildung 8.2: Putative Proteinkomplexe von *L. monocytogenes*. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des in Abbildung 8.1. dargestellten BN/ SDS-Gels. Proteine, die sowohl durch ihre Lage auf einer vertikalen Linie im Gel als auch durch die Lage der kodierenden Gensequenzen auf demselben Operon Rückschlüsse auf Proteinkomplexe zulassen, sind durch Pfeile markiert.

Tabelle 8.3: Identifizierte Proteinspots aus dem BN/SDS (Abb. 8.1/Abb. 8.2). Die Vorhersage von Signalpeptiden (SP) wurde mit Hilfe von SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) durchgeführt. Der „GRAVY“-Wert wurde mit Hilfe von ProtParam (<http://expasy.hcuge.ch/sprot/protparam.html>) ermittelt und die Anzahl der Transmembrandomänen (TM) richtet sich nach den Angaben von Arai und Kollegen (2002).

Spot	Gen	Funktion	SP	GRAVY	TM
1	fus	Translationselongationsfaktor G	-	-0.343	-
2	Lmo2411	Unbekannt	-	-0.406	-
3a	gnd	Homolog zu 6-Phosphoglukonatdehydrogenase	-	-0.244	-
3b	Lmo2414	Homolog zu Aminotransferase	-	-0.234	-
4	Lmo2636	Unbekannt, Homolog zu Lipoproteinen	7	-0.421	-
4	tcsA	T-Zell stimulierendes Antigen, TcsA	6	-0.461	-
6	Lmo1847	Substratbindungsprotein (Metallionen-ABC-Transporter)	6	-0.412	-
7	menB	Homolog zu Dihydroxynapthoicsäuresynthetase	-	-0.267	-
8	Lmo2256	Unbekannt	-	-0.139	-
9	rpsG	Ribosomales Protein S7	-	-0.546	-
10	groEL	Homolog zu Hitzeschockprotein (Chaperonin) GroEL	-	-0.066	-
11	gap	Homolog zu Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	-	-0.115	-
12	pdhA	Homolog zu Pyruvat-Dehydrogenase (alpha Untereinheit)	-	-0,351	-
13	pdhB	Homolog zu Pyruvat-Dehydrogenase (beta Untereinheit)	-	0,021	-
14	pgi	Glucose-6-phosphat-Isomerase	-	-0,301	-
15	infC	Translationinitiationsfaktor IF-3	-	-0.579	-
16	kat	Katalase	-	-0,688	-
17	Lmo1422	Homolog zu Permease (Glycinebetaine/Carnitine/Cholin-ABC-Transporter)	-	0.192	6
18	Lmo2193	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Oligopeptid-ABC-Transporter)	-	-0.185	-
19/21/25	Lmo2192	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (Oligopeptid-ABC-Transporter)	-	-0.496	-
20/26	Lmo2195	Homolog zu Permease (Oligopeptid-ABC-Transporter)	5	0.667	5
22	fri	nicht-Häm-eisenbindendes Ferritin	-	-0.371	-
23	rplS	Ribosomales Protein L19	-	-0.497	-
24	fruA	homolog zu Phosphotransferasesystem (PTS), fructosespezifisches Enzyme II, ABC-Komponente	-	0,455	10
27	Lmo2215	Homolog zu ATP-Bindungsprotein (ABC-Transporter)	-	-0.222	-
28/29	pykA	Homolog zu Pyruvatkinasen	-	-0.034	-
30	Lmo0560	Homolog zu NADP-spezifische Glutamatdehydrogenase	-	-0.203	-
31	polA	DNA-Polymerase I	-	-0.303	-
32	atpA	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (alpha-fette)	-	-0.114	-
33	eng	Homolog zu Enolase	-	-0.244	-
34	atpG	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (gamma-Kette)	-	-0.255	-
35	atpD	Homolog zu H ⁺ -transportierender ATP-Synthase (beta-Kette)	-	-0.135	-
36	Lmo0982	Homolog zu Glukanase and Peptidase	-	-0.323	-
37a	Lmo1217	Homolog zu Endo-1,4-beta-Glukanase und Aminopeptidase	-	-0.067	-
37b	Lmo1611	Homolog zu Aminopeptidase	-	-0.141	-